

Chapitre 1 : Le Monde microbien

Introduction

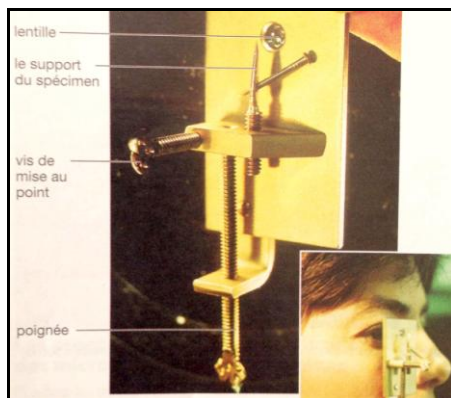
Les micro-organismes aussi appelés microbes et protistes, forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu. C'est leur seul point commun, car ils diffèrent et varient par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie.

Les protistes se composent : **des bactéries, des protozoaires, des champignons (Mycètes)** microscopique, et **des algues**. Les **virus** sont considérés comme des micro-organismes non vivants, acellulaires qui dépendent entièrement des cellules hôtes infectées.

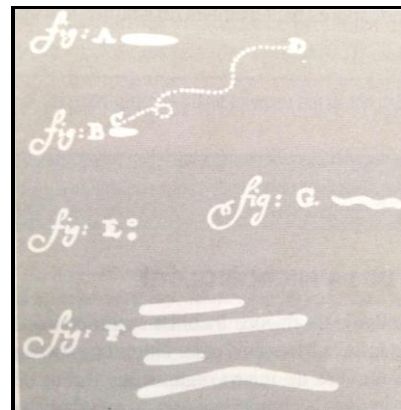
1.1. Historique

Robert Hooke (1665) est le père de la théorie cellulaire (**la plus petite unité structurale d'un organisme vivant est la cellule**).

Anthony VAN LEEUWENHOEK (1632-1723), un marchand hollandais et grand amateur d'instruments d'optique, découvrit et décrivit pour la première fois, dans une série de lettres à la « *Royal society of London* », entre 1674 et 1687, **le monde microbien**. Il appela ces micro-organismes **des animalcules**. Il observa, l'eau de pluie, sa propre matière fécale, la matière prélevée de ses dents.



Microscope d'Anthony Van Leeuwenhoek

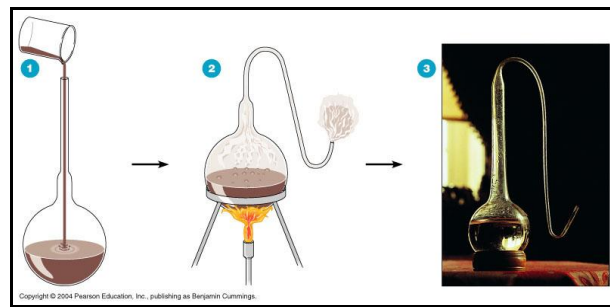


Bactéries de la bouche dessinées par A. Van Leeuwenhoek

Le concept ou théorie de la génération spontanée existe depuis plusieurs dizaines de siècles. Le philosophe Aristote défendait cette théorie. On croyait que les organismes vivants naissaient de végétaux et d'animaux en décomposition grâce à une mystérieuse force vitale. Après la découverte des animalcules par Van Leeuwenhoek, cette théorie se confirma, notamment par les expériences de **John Needham, en 1745**, qui démontra la croissance des micro-organismes dans des flacons contenant des bouillons de viande ou de maïs. Ces bouillons furent chauffés avant d'être enfermés dans des flacons. Puis, **Lazzaro Spallanzani** démontra que les flacons de **Needham** n'étaient pas étanches. Il ferma les flacons avant le chauffage et aucune croissance ne fut observée. **Donc, les micro-organismes proviennent de l'air**. Ses travaux furent critiqués par **Needham** (les bouchons ont empêché l'entrée de la force vitale !) et par **Lavoisier** (La fermeture des flacons empêche l'entrée de l'oxygène, nécessaire à la vie !).

Le concept de la génération spontanée resta très ancré dans les esprits jusqu'en 1861. Le chimiste **Louis Pasteur**, partisan de la biogenèse prit en charge cette question. Il montre qu'aucun micro-organisme ne se développe dans un ballon fermé et stérilisé contenant de la matière organique. Bref, que la génération spontanée n'existe pas. Il affirma la biogenèse (que l'apparition de vie dans une solution non vivante provient

de la contamination par des micro-organismes présents dans l'air). Cette prouesse lui vaudra le prix de l'académie des sciences en 1862.



Expérience de Pasteur qui acheva la théorie de la génération spontanée

La microbiologie **est devenue une science à part entière**, lorsqu'on a réussi à obtenir **des cultures pures**, grâce au développement **des milieux de culture gélosés** (solides) et **les boîtes de Petri**. Aussi, grâce à la **fabrication de microscopes** plus puissants que les premières loupes et l'élaboration de **colorations spécifiques**...

La relation directe entre une bactérie et une maladie a été démontrée par **le médecin allemand Robert Koch (1843-1910)** en étudiant la tuberculose et son agent *Mycobacterium tuberculosis*. Pour affirmer cette causalité, il faut vérifier plusieurs critères rassemblés sous le nom de « **Postulats de Koch** ».

1-Le micro-organisme doit être présent chez tous les sujets malades, et absent chez les sujets sains.

2-Le micro-organisme doit être isolé et cultivé en culture pure

3-A partir de ces cultures pures on doit être en mesure de provoquer la maladie par inoculation expérimentale

4-Le même micro-organisme doit être de nouveau isolé des malades expérimentaux.

En même temps et par la suite d'autres scientifiques célèbres :

Tyndall 1877 : découverte des spores, leur thermorésistante et il mit au point **la tyndallisation**.

Winogradsky 1856-1953 : Travaux sur les bactéries nitrifiantes, les bactéries fixatrices de l'azote, sulfureuses et la décomposition bactériennes de la cellulose dans les sols.

Beijerinck 1851-1931 : les bactéries fixatrices de l'azote, symbiotiques.

1.2 Place des micro-organismes dans le monde vivant

Depuis leur découverte par **Anthony van Leeuwenhoek**, la place des bactéries dans le monde vivant a beaucoup évoluée. Le botaniste suédois **Carl van Linné** (1735), élaborait une première classification des organismes vivants en deux règnes *Plantae* et *Animalia*. En 1857, **Karl van Nägeli** proposa de classer les bactéries et les champignons dans le règne des Plantes.

1.2.1 Classification de Haeckel

En 1866, **E. Haeckel** divise le monde vivant en trois règnes, **le règne animal**, **le règne végétal** et **le règne des protistes** qui rassemble les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries.

1.2.2 Distinction entre cellules eucaryotes et procaryotes selon Edward Chatton

En 1937 et grâce à l'invention du microscope électronique, **Edward Chatton** mis en opposition deux types de cellules, la **cellule eucaryote** (noyau est entouré d'une membrane et qui renferme des d'organites cellulaires) et la **cellule procaryote** (noyau sans membrane et dont l'organisation est très simple).

En 1938, **H.F. Copeland** sépare le règne des bactéries (ou "*Monera*") de celui des protistes. Cette définition des procaryotes fut renforcée en 1961 par **Roger Stanier**.

1.2.3 Classification selon Murray

En 1968, **R.G.E. Murray**, dans la continuité du travail d'**E. Chatton**, divise le monde vivant en deux règnes, celui des "*Eucaryotae*" et celui des "*Procaryotae*" (ou "*Monera*").

Au sein du règne des Procaryotae, R.G.E. Murray distinguait 04 divisions retrouvées dans le manuel de Bergey: La division des "*Gracilicutes*". Regroupant les bactéries à Gram négatif.

La division des "*Firmicutes*". Regroupant les bactérie à Gram positif.

La division des "*Tenericutes*". Bactéries dépourvues de paroi.

La division des "*Mendosicutes*". Archaeobactéries.

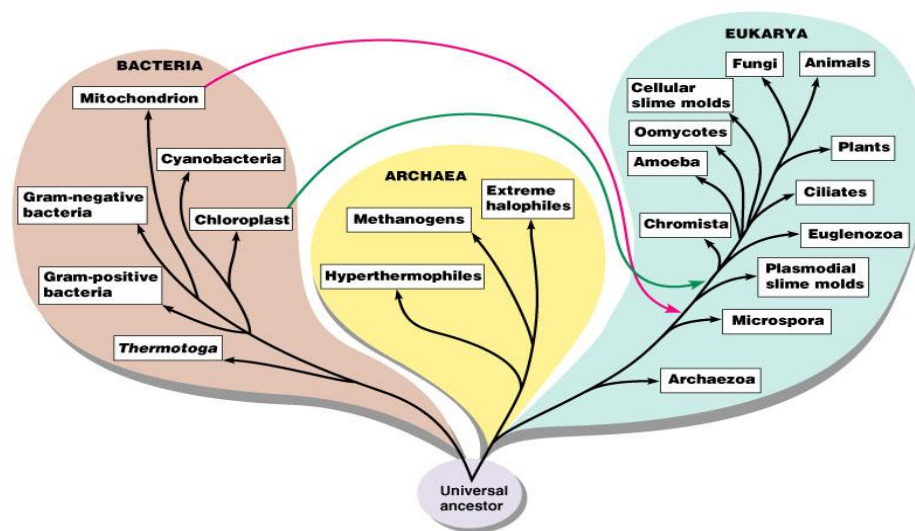
1.2.4 Classification à cinq règnes

En 1969, **Robert H. Whittaker** décrit une classification à cinq règnes. Quatre règnes eucaryotes (**Animal, Végétal, Champignons et Protistes**). Les procaryotes se regroupent dans le règne des **monères**.

Bien qu'elles ne peuvent s'accorder, les deux classifications, d'**E. Chatton** et de **R.H. Whittaker** ont existé simultanément pendant une longue période.

1.2.5 Classification Génomique selon , CR, Woese (1978)

Le développement des techniques de **biologie moléculaire** a permis de caractériser les gènes qui codent pour les **ARN ribosomiaux (ARNr)**. En comparant une multitude de séquences d'ARNr 16S, appartenant à divers organismes vivants, il est arrivé à diviser les organismes vivants en **trois domaines**. Le domaine des **Bacteria** ou **Eubacteria**, le domaine des **Archaea** et le domaine des **Eucarya** (animaux, plantes, les mycètes et ls protistes).



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Arbre phylogénétique universel

1.3 Les Protistes

Les protistes sont définis par des propriétés communes et spécifiques : **leur taille microscopique, leur organisation simple et unicellulaires pour la plus part. Si pluricellulaires**, alors leurs cellules sont équivalentes, sans aucune différence morphologique, physiologique ou fonctionnelle. Les protistes se distinguent des animaux et des végétaux par leur structure, leur physiologie et leur écologie.

1.3.1 Structure et fonction

Une taille de loin plus réduites que celles des cellules animales et végétales. Les cellules animales et végétales sont incapables d'exister indépendamment de leur organisme.

La taille réduite des protistes confère des avantages physiologiques. Un rapport surface /volume supérieur à celui de tous les autres organismes vivants. Ce qui permet des échanges et des interactions remarquables avec le milieu. Sans oublier une dissémination et une distribution dans la nature unique et impressionnante.

1.3.2 Reproduction

Les protistes et en particulier les bactéries ont des modes de reproduction simples, spécifiques et rapides (temps de génération courts). ***Escherichia coli*** par exemple, se reproduit par simple division binaire en 20 minutes. Cela se produit bien sûr en conditions optimales de culture en laboratoire. Ces taux de croissance exceptionnels induisent des rendements de croissances incomparables.

1.3.3 Métabolisme

Les micro-organismes et en particulier les bactéries ont une propriété fondamentale qui est la diversité de leur métabolisme. Individuellement, chaque micro-organisme est spécifiquement adapté à la métabolisation d'un nombre plus ou moins limité de substrats. Ce qui explique leur distribution en fonction des caractéristiques nutritionnelles et physicochimiques du milieu. Mais, pris dans leur ensemble, les micro-organismes peuvent métaboliser toutes les substances organiques naturelles et même synthétiques.

- Ce processus constitue **la minéralisation de la matière vivante et le recyclage des éléments chimiques** qui forment la matière organique. Ceci permet de préserver l'environnement.

- Une des armes métaboliques des bactéries est la synthèse d'enzymes inductibles uniquement en présence de leurs substrats spécifiques. Une adaptation exceptionnelle aux conditions du milieu.

1.3.4 Ecologie

Les micro-organismes sont ubiquitaires, ils sont présents dans tous les écosystèmes :

- **Dans les mers et les océans**, ils constituent **la biomasse** (base du 1^{er} échelon de la chaîne alimentaire) qui nourrit l'ensemble de la faune marine.

- **Dans le sol**, ils jouent un rôle dans la décomposition de la matière organique, la fourniture de l'azote assimilable aux plantes, la minéralisation de la matière organique. Les micro-organismes participent activement aux équilibres gazeux de l'atmosphère, en étant à la fois producteurs et consommateurs, d'O₂, H₂, N₂, CO₂, CH₄.

- **Le long de l'appareil digestif des animaux**. En effet, ce dernier est tapissé de bactéries très utiles à notre bien-être digestif, puisqu'elles nous procurent les enzymes nécessaires à la digestion de certains aliments. De plus, elles évitent que d'autres micro-organismes dangereux colonisent le tube digestif et nous rendent

malades. La majorité d'entre elles sont apportées à la naissance par la mère, puis, par l'environnement et la nourriture. Tout au long de la vie, les populations évoluent.

1.4 Organisation biologique des protistes

Les protistes se présentent selon trois types différents d'organisation biologique :

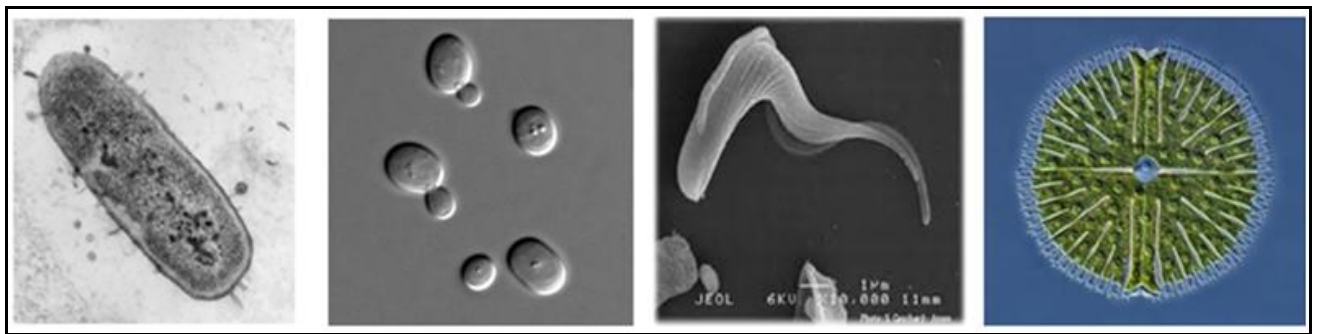
Unicellulaires

Pluricellulaires

Coénocytiques

1.4.1 Protistes unicellulaires

C'est le cas de la plus part des protistes, **bactéries, protozoaires, levures et de nombreuses algues**. Une cellule unique qui se suffit à elle-même et qui constitue un organisme complet et autonome, donc doué de toutes les fonctions de la vie : nutrition, croissance et reproduction.



Bactérie

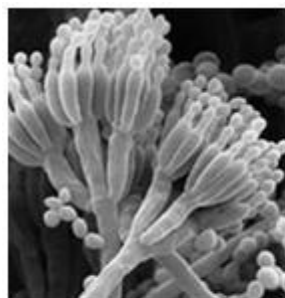
Levures

Protozoaire

Algue unicellulaire

1.4.2 Protistes pluricellulaires

Ce sont principalement **des champignons (Fungi)** et des **algues** formés de plusieurs cellules identiques, sans aucune différence structurale ou physiologique.



Penicillium camembert

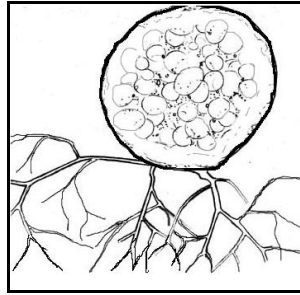


Penicillium notatum



Algue bleu

1.4.3 Protistes coenocytiques

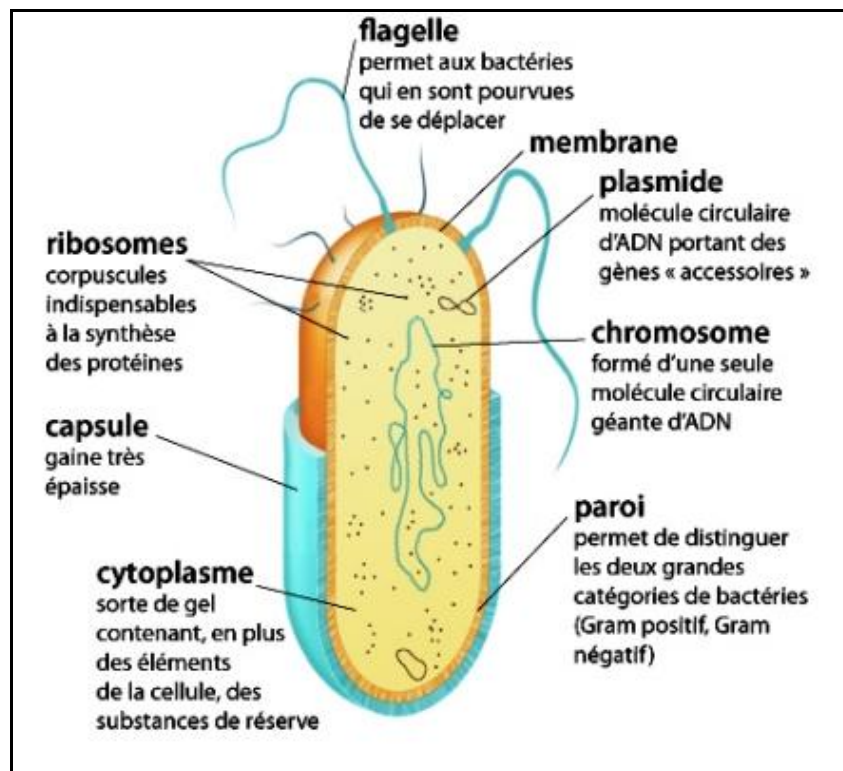


Chytridiomycètes

Ces organismes qui peuvent être de grande taille, se composent d'un cytoplasme important incluant de nombreux noyaux sans cloisonnement (**septum**) entre eux. Ils sont majoritairement aquatiques, parasites ou saprophytes. Ce sont les seuls membres des champignons possédant le caractère de la mobilité.

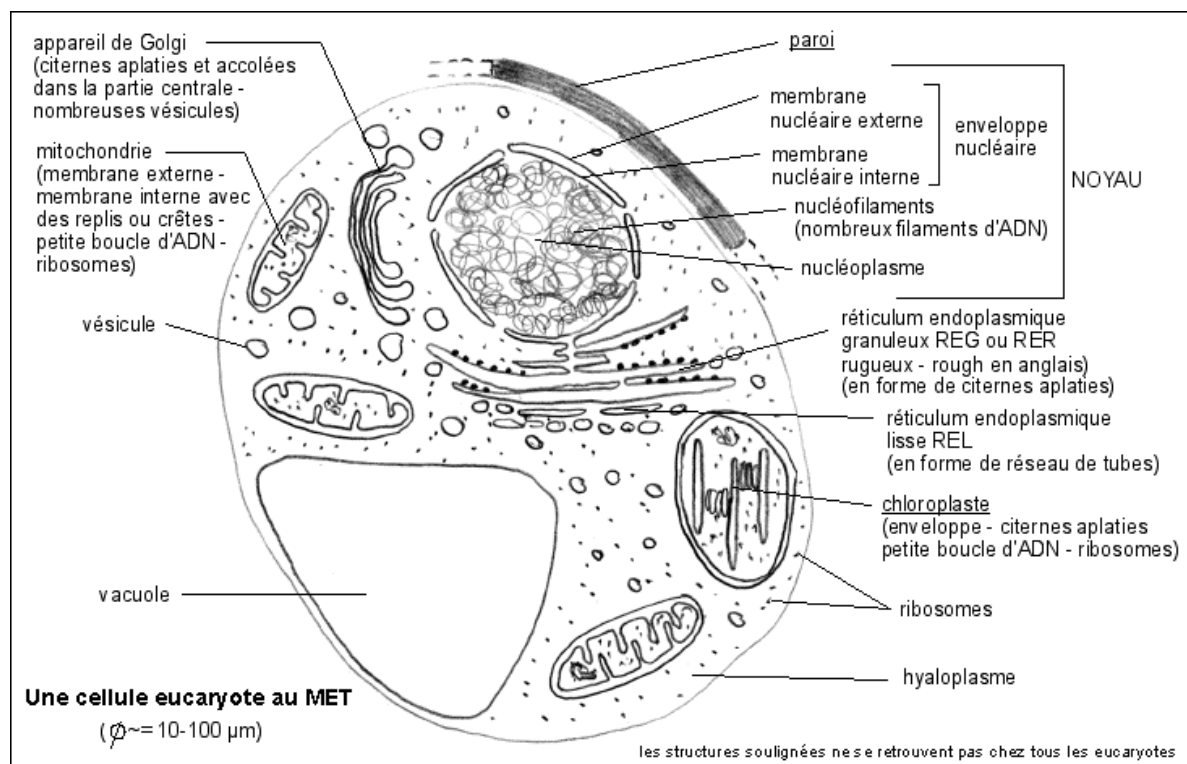
1.5 Caractéristiques générales des cellules procaryotes et eucaryotes

On distingue encore une fois les protistes procaryotes et les protistes eucaryotes. Sur la base de la présence ou l'absence d'une membrane nucléaire séparant le cytoplasme du matériel génétique « ADN ». La microscopie électronique a mis en évidence d'autres différences structurales très importantes et fondamentales, induisant des comportements physiologiques et de reproduction très différents.



Organisation cellulaire d'une bactérie

Dessin Tom Sam You © Archives Larousse



Organisation d'une Cellule Eucaryote

Caractères de différenciations entre Eucaryotes et Procaryotes

Le tableau suivant résume les caractéristiques des eucaryotes et des procaryotes tout en faisant apparaître les caractères de différenciation.

Caractéristiques	Cellule Procaryote	Cellule Eucaryote
Taille typique	1-10 µm	10-100 µm
<u>Type de noyau</u>	nucléoïde (pas de véritable noyau)	vrai noyau avec double membrane
Division de la cellule	division simple	mitose (réplication de la cellule) méiose (menant à la formation de gamètes)
Organisation génétique		
Membrane nucléaire	Non	oui
Nombre de chromosomes	1 chromosome (Haploïde)	Plusieurs chromosomes Diploïde)
Chromosome circulaire	Oui	non
Histones	Non	oui
Nucléole	Non	oui
Echange génétique	transfert unidirectionnel	fusion de gamètes
ARN et synthèse des protéines	couplé au cytoplasme	synthèse d'ARN dans le noyau synthèse de protéines dans le cytoplasme
Premier acide aminé initiant la synthèse d'une chaîne polypeptidique	méthionine ou N-formylméthionine	méthionine
Structures cellulaires et organites		
Réticulum endoplasmique	Non	oui
Appareil de Golgi	Non	oui
Lysosomes	Non	oui
Mitochondries	Non	oui
Chloroplastes	Non	oui chez les plantes
Microtubules	Non	oui
Paroi cellulaire avec peptidoglycane	Oui	non
Présence de stérols dans les membranes	Non	oui
Endospores	oui, parfois	non
Taille des ribosomes	70 S	80 S, sauf mitochondries et chloroplastes
Localisation des ribosomes	dispersés dans le cytoplasme	dispersés dans le cytoplasme ou liés au réticulum endoplasmique
Constantes de sédimentation des ARN ribosomaux	16S, 23S, 5S	18S, 28S, 5,8S, 5S
Attributs fonctionnels		
Phagocytose	Non	oui, parfois
Pinocytose	Non	oui, parfois
Flux cytoplasmique	Non	oui
Mouvement de la cellule	flagelles faites de flagelline	flagelle et cils faits de tubuline
Site du transport des électrons	membrane cellulaire	membrane des organites

Les bactéries sont des micro-organismes que l'on rencontre pratiquement partout. Leur présence est souvent manifeste : les blessures s'infectent, le lait s'acidifie, la viande se putréfie, mais, on ne peut les voir qu'au microscope.

Ils sont généralement unicellulaires et leurs cellules sont des cellules de type procaryote.

Les caractères propres des procaryotes ont été décrits dans le tableau « différences entre procaryotes et eucaryotes »

Des procaryotes nommés algues bleu-vert jusqu'aux années soixante, parfois assimilés aux bactéries, ont reçu le nom de cyanobactéries. Ces organismes ont des caractères communs aux bactéries, mais ils en diffèrent aussi.

Pour cela nous utiliserons le terme bactérie dans un sens restrictif qui exclut les cyanobactéries.

« Les bactéries d'intérêt médical et vétérinaire se recrutent au sein du domaine des "*Bacteria*". Pour des raisons pratiques, on peut diviser le domaine des "*Bacteria*" en trois grands groupes. Les procaryotes à Gram négatif pourvus d'une paroi, les procaryotes à Gram positif pourvus d'une paroi et les procaryotes dépourvus de paroi ». La classification de Bergey sépare les bactéries en 4 divisions, selon la présence ou non d'une paroi et selon la nature de cette paroi, que l'on peut déterminer grâce à la coloration de GRAM.

Les bactéries à GRAM négatif

Les bactéries à GRAM positif

Les mycoplasmes (bactéries sans paroi)

Les archaeobactéries

Dans les années 1970, grâce aux séquençages de l'ARN ribosomal, on a constaté que les bactéries pouvaient être divisées en deux taxons : Les eubactéries et les archaeobactéries. « Eubactéries ou bactéries vraies » regroupent les 3 premières divisions.

1.5.1 Bactéries à GRAM négatif

Ils représentent plus de 66 % des bactéries répertoriées dans la classification de Bergey. Elles possèdent une paroi qui donne à la cellule sa forme. Cette paroi est formée d'une couche de peptidoglycane comprise entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique.

Sur une base morphologique on distingue dans cette division les groupes suivants :

Les bacilles à Gram négatif

Ce sont des bactéries en forme de bâtonnet. La mieux connue et la plus étudiée est *Escherichia coli*.

On a par exemple, les agents de maladies infectieuses humaines :

La peste : *Yersinia pestis* ; La dysenterie : *Shigella dysenteriae* ; La Typhoïde : *Salmonella typhimurium*.

Non pathogènes saprophytes du tube digestif, le genre *Bactéroïdes*.

D'autres bacilles GRAM négatif, sont des agents très importants de l'environnement. On a le genre : *Rhizobium* (fixation de l'azote) *Nitrobacter* et *Thiobacillus*.

D'autres bactéries présentes dans le sol, l'eau douce ou l'eau de mer, certaines sont pathogènes, forment la famille des *Pseudomonadaceae*. On distingue, *Pseudomonas*, *Acetomonas*, *Xanthomonas*.

Les cocci à Gram négatif

De forme sphérique, arrondie. Les plus importantes sont les agents de deux maladies humaines graves.

Neisseria gonorrhoeae ou « **gonocoque** » responsable de la gonorrhée, maladie sexuellement transmissible.

Les spirochètes

De forme hélicoïdale, ils peuvent atteindre des tailles considérables (300 µm) par rapport aux autres bactéries. Ils possèdent une gaine externe multicouche de peptidoglycanes recouvrant la membrane plasmique. Cet ensemble est appelé le cylindre protoplasmique. Ils ont un appareil locomoteur complexe, composé de filaments axiaux associés au flagelle, s'enroulant sur toute la longueur du cylindre protoplasmique et fixés à ses extrémités.

Les spirochètes pathogènes de l'homme :

Leptospira interrogans agent d'une jaunisse infectieuse.

Treponema pallidum agent de la syphilis chez l'homme. Il mesure 5 à 15 µm de longueur. On ne peut les cultiver que dans des lapins.

Les rickettsies

Ce sont de très petites bactéries polymorphes, parasites intracellulaires obligatoires et pathogènes de l'homme. Elles sont transmises par les piqûres d'insectes, le pou, la puce et la tique.

Il est impossible de les cultiver avec des méthodes classiques de cultures.

L'un des agents infectieux le plus représentatif est ***Rickettsia prowazekii***, agent du typhus épidémique, transmis par le pou (par piqure ou par les excréments de pou contenant les microbes à travers une blessure). Les rickettsies sont capables de produire une partie de leur énergie par l'oxydation de quelques substrats tels que le glucose et le pyruvate.

Les Chlamydias

Se sont des « parasites intracellulaires obligatoires » comme les rickettsies, mais ils sont incapables de produire seuls la moindre énergie. Ils dépendent entièrement de la cellule hôte. Ce qui explique la taille réduite de leur génome. Ils ont une forme coccoïde de 0.2 à 0.7 µm de diamètre.

L'agent infectieux le plus connu chez l'homme est ***Chlamydia trachomatis*** (Trachome). C'est une infection et une inflammation des conjonctives de l'œil. Il peut entraîner une cécité partielle ou totale. Il existe aussi une forme transmissible sexuellement et qui peut provoquer l'infertilité suite à l'infection.

Les Cyanobactéries

Les cyanobactéries sont des bactéries photo-autotrophes obligatoires et photosynthétiques. Certaines peuvent utiliser des substrats carbonés. Elles possèdent la chlorophylle (a) ou des pigments appelés phycobiline.

De 2 à 200 µm pour les espèces marines, isolées ou en colonie, immobiles ou mobiles par glissement. Elles possèdent un organite particulier, « la vacuole à gaz ».

Par opposition aux bactéries, se sont les seules à posséder des acides gras polyinsaturés.

1.5.2 Les Bactéries à Gram Positif

Moins nombreuses que les GRAM négatif. Leur paroi est plus simple mais plus épaisse. D'un aspect uniforme, elle est constituée de peptidoglycanes dans lesquels sont dispersés d'autres composants comme les acides teïchoïques.

Elles sont très variées sur le plan morphologique, physiologique et écologique.

Les Bacilles à Gram positif

On distingue deux groupes principaux :

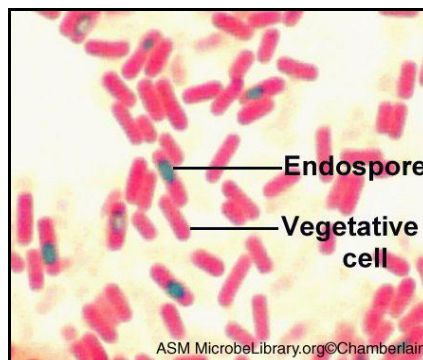
Le groupe qui forme des endospores, incluant les genres *Clostridium* et *Bacillus*. L'endospore est une forme de résistance aux conditions défavorables.

Le groupe des **Lactobacilles** qui sont non sporulants.

Les genres *Clostridium* et *Bacillus* sont très répandus dans le sol, l'eau et d'autres habitats.

Genre *Bacillus*

La plus part sont mobiles sauf *Bacillus anthracis*, aérobies stricts ou Anaérobies facultatifs. La présence d'air n'inhibe pas la formation d'endospore. Ils synthétisent la catalase. Toutes les espèces sont chimio-organotrophes. Ils peuvent croître à 65°C comme c'est le cas pour *Bacillus stearothermophilus*.



Bacillus avec endospore colorée au vert de malachite

Genre *Clostridium*

On les trouve dans le sol, dans la vase, dans les intestins des animaux et des hommes et sont très pathogènes. La plus part mobiles, Gram (+), les vieilles cultures peuvent être Gram (-).

La majorité sont anaérobies strictes, certains peuvent tolérer une faible quantité d'oxygène. Catalase (-). La formation de spore est inhibée par l'oxygène. Les plus rencontrés en microbiologie médicale sont :

Clostridium botulinum : 2 à 9 µm, anaérobie strict. **Agent du botulisme**. Ils existent 7 types principaux de souches (A à G) selon la toxine qu'ils produisent.

Clostridium perfringens : 3 à 9 µm, immobile. Il tolère une faible quantité d'oxygène et forme rarement des endospores. Il dégage du gaz dans des milieux enrichis. **Agent d'intoxications alimentaires, la gangrène gazeuse**.

Clostridium tetani : 2 à 5 um, mobiles. Il est responsable du **tétanos**. Lorsqu'il sporule, la spore est à l'extrémité du bacille, il ressemble à une baguette de tambour.



***Clostridium tetani* sporulé**

Les cocci à Gram positif

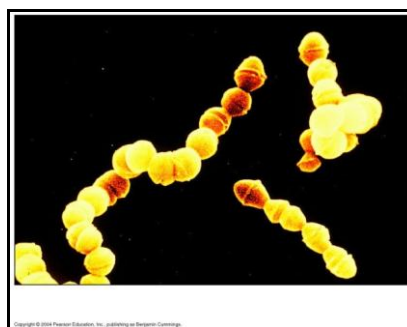
Les deux principaux genres sont les genres ***Streptococcus*** et ***Staphylococcus***. De nombreuses espèces sont pathogènes.

Staphylococcus aureus est présent sur la peau et sur les muqueuses de l'homme et des animaux. Il est responsables d'intoxication alimentaire et d'infections graves.



Staphylococcus aureus

Les streptocoques peuvent provoquer des infections qui touchent tous les organes humains, mais d'autres sont utilisés dans l'industrie laitière « ***Streptococcus thermophilus*** » dans la fabrication du yaourt. Certains streptocoques sont dits **inhibiteurs**, car ils produisent des antibiotiques comme la nisine par ***Streptococcus lactis*** et la diplococcine par ***Streptococcus cremoris***.



***Streptococcus* sp**

Les actinomycètes

Se sont des organismes Gram (+) à Gram variable. A un moment au moins de leur croissance, ils forment **des hyphes comme les champignons. Mais, ils ont les caractéristiques des procaryotes**. Se sont des chimioorganotrophes dont la croissance est optimale en anaérobioses.

Les Actinomycètes les plus pathogènes pour l'homme sont de la famille **des Mycobacteriaceae** :

Mycobacterium Tuberculosis : agent de la tuberculose

Mycobacterium leprae : agent de la lèpre

Mycobacterium lepromatosis : **Nouveau agent de la lèpre, non cultivable (2015).**

<http://www.pnas.org/content/early/2015/03/18/1421504112.full.pdf>.

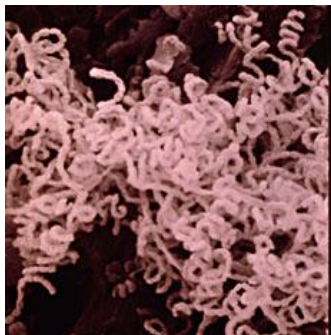
Les Actinomycètes utiles sont de famille des Streptomycetaceae.

Ils forment des hyphes stables qui ne se fragmentent pas. Leur paroi contient un composant particulier, l'acide LL-diaminopimélique. Cette famille contient 04 genres. Le plus important est le genre ***Streptomyces***.

Streptomyces est aérobic, il se rencontre dans le sol, certains sont pathogènes. Ils forment des hyphes avec des septums (cloisons), espacés et très colorés. La culture sur gélose donne un mycélium rampant. Plus tard il devient aérien et à la maturité de la colonie, les spores se forment.

S. griseus : cette espèce produit **deux antibiotiques** importants. **La streptomycine et la cycloheximide** qui a une action antifongique.

S. scabies : espèce du sol, responsable de **la gale de la pomme de terre**.



Les Actinomycètes



La gale de la pomme de terre

1.5.3 Les mycoplasmes

Cette division regroupe **des eubactéries sans paroi**. Certaines espèces sont parasites et pathogènes. De 0.15 à 0.3 um de diamètre, de forme variable, certaines souches se déplacent par glissement. Leur membrane plasmique contient des stérols qu'elles puisent des cellules parasitées. Ils sont très sensibles aux chocs osmotiques et aux tensioactifs.

« Leur génome est très petit par rapport aux autres eubactéries. 1/4 à 1/5 d'*Escherichia coli*. Ce qui explique leur mode de vie parasite intracellulaire obligatoire ».

Mycoplasma pneumoniae : la pneumonie chez l'homme. En culture il donne des colonies en œuf au plat, très typiques (veilles cultures).

1.5.4 Les archaeobactéries

Les archaeobactéries sont adaptées à la vie dans des conditions de vie extrêmes (forte salinité, haute température, faible pH, sans oxygène). Des conditions qui ressemblent à celles de la terre lors de l'apparition de la vie. Se sont des bactéries primitives, d'où leur nom. Pour leurs caractéristiques et leur comparaison avec les eubactéries voir tableau suivant :

	"Bacteria"	"Archaea"
Présence d'acide muramique dans la paroi (si la paroi est présente)	Oui	Non
Peptidoglycane	OUI	NON
Lipides membranaires	Acides gras aliphatiques liés au glycérol par des liaisons Ester	Chaînes hydrocarbonées liées au glycérol par des liaisons Ether
Premier acide aminé initiant la synthèse d'une chaîne polypeptidique	N-formylméthionine	Méthionine
Sensibilité aux bêta-lactamines	Variable	Non
Synthèse des protéines inhibée par l'anisomycine	Non	Oui
Synthèse des protéines inhibée par la streptomycine et le chloramphénicol	Oui	Non
Synthèse des protéines inhibée par la toxine diphthérique	Non	Oui
Présence d'introns dans les gènes codant pour les ARNt	Non	Oui
Inhibition de la RNA polymérase DNA dépendante par la rifampicine	Oui	Non

Tableau comparatif entre eubactéries et archaeobactéries

On distingue 3 grands groupes :

Les halophiles extrêmes

Ils nécessitent une présence **de sel** à 9%. Ils tolèrent des pH basiques de l'ordre de 11.5. On les trouve dans les lacs salés, les marais salants, saumures (eau très salée). Se sont les seules Archaeobactéries capables de photosynthèses grâce à des pigments caroténoïdes, qui leur confèrent une couleur rose. Le genre *Halobacterium* en est l'exemple type.

Les Thermophiles extrêmes

La température optimale de croissance est de l'ordre de 80°C et même plus. Anaérobies et résistants aux pH acides extrêmes. Ils sont thermoacidophiles. *Pyridictium occultum* : 105°C ; *Sulfolobus sp* : 87°C à 90°C et un pH1.

Les Méthanogènes

Anaérobies stricts, comme *Méthanobactérium*, il est capable de produire le méthane (**CH₄**) à partir de gaz carbonique (**CO₂**). Saprophytes du tube digestif des ruminants, ils sont capables de libérer plus 1 à 2 milliards de tonnes de méthanes par an. Les ruminants et leur méthane contribuent dans l'effet de serre et le réchauffement de l'atmosphère. On les trouve également dans les sédiments des eaux de sources, sources thermales et les stations d'épuration.

Chapitre 2 : La Cellule bactérienne

Les bactéries typiques sont des organismes unicellulaires procaryotes. Elles n'ont pas de noyau et leur génome est le plus petit des cellules vivantes.

Les bactéries se divisent en eubactéries et en archaebactéries.

2.1 Techniques d'observation de la cellule bactérienne

Observation de la cellule

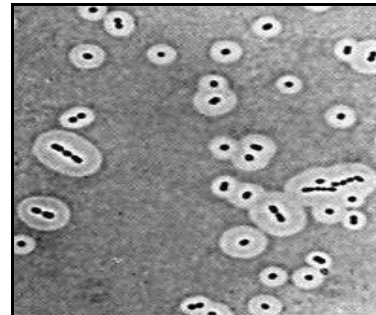
La mise au point du premier microscope par A. Van Leeuwenhok marque le point de départ de la microbiologie. Depuis, cet appareil a été largement amélioré. Avec des grossissements pouvant aller jusqu'à 2500 x, on peut observer des structures de l'ordre de 1 μ M.

On distingue :

L'observation entre lame et lamelle, dite à **l'état frais** de bactéries en milieu liquide et sa variante, **la coloration à l'encre de Chine** (pour la mise en évidence de la capsule). Les capsules correspondent au halo clair entourant les corps bactériens en noir.



Observation à l'état frais



Coloration à l'encre de chine

Observation **des frottis séchés, fixés et colorés**.

Les colorations de Gram et de Ziehl-Nielsen permettent la reconnaissance des bactéries pathogènes, d'autres font apparaître spécifiquement les cils, les flagelles, les spores...

Les frottis sont observés à l'immersion avec une goutte d'huile spéciale entre l'objectif et la préparation, cela permet d'obtenir une image plus nette.

Toutes ces méthodes font partie de **la microscopie photonique** (utilisation du rayonnement lumineux).

Pour observer des structures de l'ordre de 5 nm à 10 nm, **on utilise la microscopie électronique**. Certaines structures peuvent retenir ou laisser passer les électrons. Cette approche nécessite ou non la fixation de l'échantillon.



a)

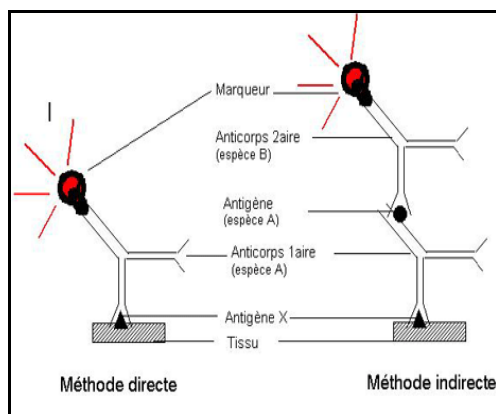


b)

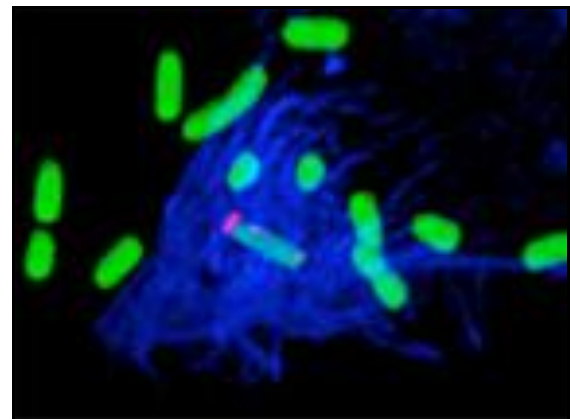
a) Microscopie électronique de *Vibron cholerae* en contact avec les villosités intestinales.

b) *Staphylococcus aureus* en microscopie électronique à balayage (MEB), qui permet d'obtenir des images « en relief » 3D, de la cellule bactérienne

Enfin, les méthodes **immunocytochimiques**, permettent de localiser dans la cellule des molécules bactériennes. On utilise des anticorps marqués par la peroxydase, la biotine ou des molécules fluorescentes comme la fluorescéine. La formation d'un complexe stable antigène-anticorps permet de repérer la présence d'une molécule dans la cellule.



a)



b)

a) Immunocytochimie directe et indirecte. b) Invasion d'une cellule épithéliale par *Shigella flexneri*. Des cellules *Hela* sont infectées par *Shigella* analysées par immunofluorescence. Bleu: F-actin; vert: bactérie; rouge: protéine bactérienne sécrétée et impliquée dans l'invasion.

Séparation des constituants cellulaires.

On utilise l'ultracentrifugation ou la centrifugation sur gradient de densité (gradient de Saccharose), pour séparer les différents organites cellulaires. Pour cela il faut ouvrir les différentes enveloppes membranes, paroi. Plusieurs méthodes pour le faire :

- Les ultrasons
- Les enzymes, tel que le lysozyme qui détruit la paroi bactérienne.
- La pression osmotique, après traitement au lysozyme, les bactéries sont placées en milieu hypotonique, gonflent et éclatent.
- La pression mécanique, ou broyage par des billes en verre pour casser la paroi et la membrane.
- Le froid par plusieurs cycles de congélation/décongélation successives.

La composition chimique d'une bactérie

On peut obtenir séparément les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

En utilisant des enzymes comme des endopeptidases, exopeptidases, glucosidases, endonucléases, exonucléases et lipases associés des techniques de chromatographie et de séquençage des protéines ou des acides nucléiques on a pu déterminer la composition chimique globale d' *Escherichia coli*.

Composition élémentaire d'*Escherichia coli*

Elément	% du poids sec
Carbone	50 +/- 5
Azote	10 à 15
Phosphore	3.2
Soufre	1.1
Cendre	12.5
Sels fixe	7.25
Sels libres	5.5

Macromolécules

Protéines	50%
ADN	3 à 4%
ARN	10%
Polysaccharides	4 à 5%
Lipides	10 à 15%

Pool de métabolites

Acides aminés, Nucléotides libres, sucres acide organiques, esters, oligopeptides, ATP, vitamines, coenzymes.

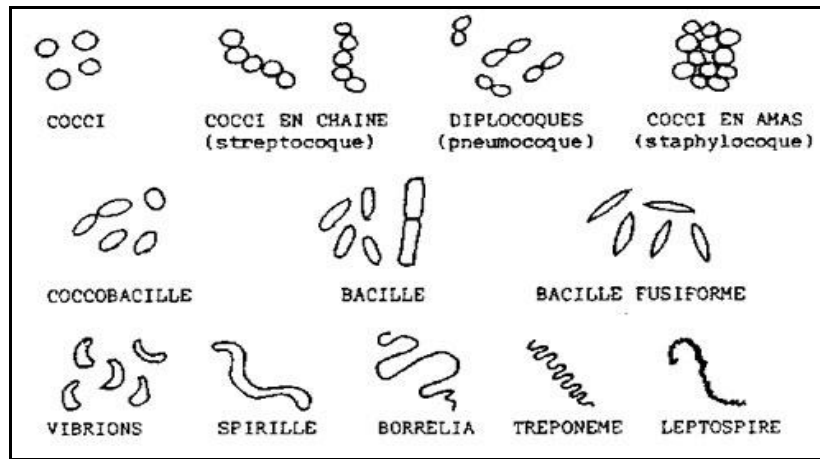
2.2 Morphologie cellulaire

2.2.1 Formes des cellules bactériennes : les bactéries sont des organismes unicellulaires de formes variées.

- bactéries de forme arrondies ou **cocci**, isolées, en chaînette, en amas (nombre variable de cellules) : **Staphylocoques, Streptocoques ...**
- bactéries de forme **allongée ou bacille**, isolée, en chaînette ou en amas, de longueur et de diamètre variables : ***E.coli, Salmonella, Bacillus***.
- bactéries de **forme spiralée** : **spirilles, spirochètes, comme *Treponema***.
- un groupe particulier de bactéries de **forme filamenteuse** se rapprochant des moisissures : **les Actinomycètes**.

2.2.2 Taille : les bactéries les plus petites ont une taille d'environ 0,2 µm (Chlamydia) et les plus longues certains Spirochètes peuvent atteindre 250 µm de long. En moyenne la taille se situe entre 1 et 10 µm

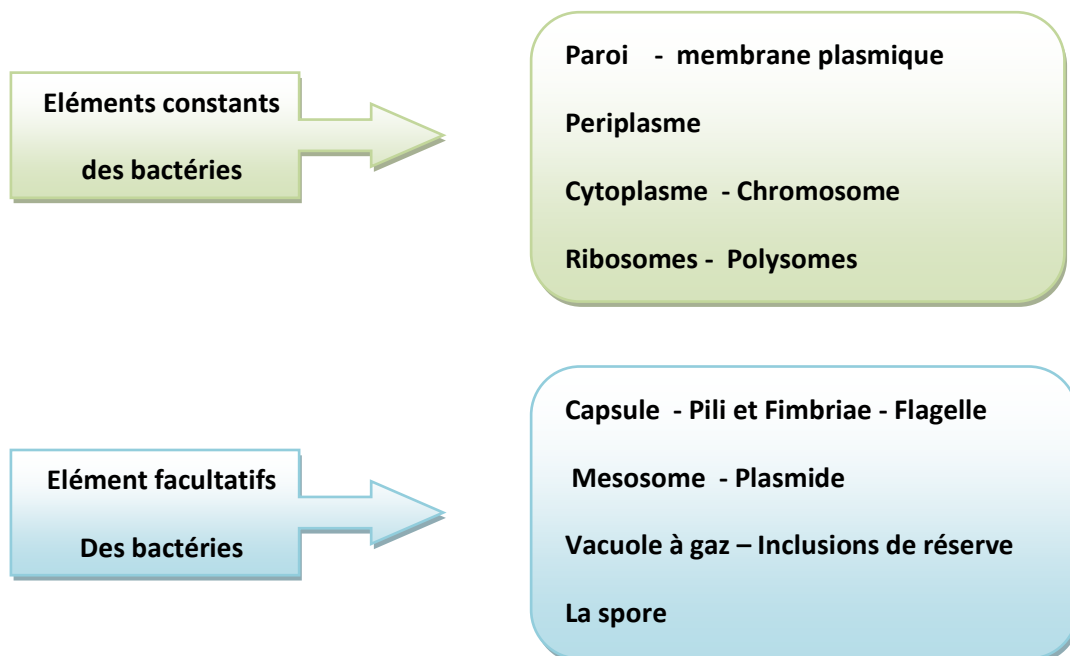
2.2.3 Associations cellulaires : une espèce bactérienne peut apparaître sous forme de cellules isolées séparées ou en groupements caractéristiques variables selon les espèces : **association par paires, en amas réguliers, en chaînette, par quatre (tétrades)**.



Les différentes formes et associations bactériennes

2.2.4 Éléments constants et inconstants de la structure bactérienne

Certaines structures sont présentes chez toutes les bactéries, ce sont les éléments « **constants** » ; d'autres sont retrouvés seulement chez certaines bactéries : ce sont les éléments « inconstants » ou « **facultatifs** ».



2.3 La Paroi

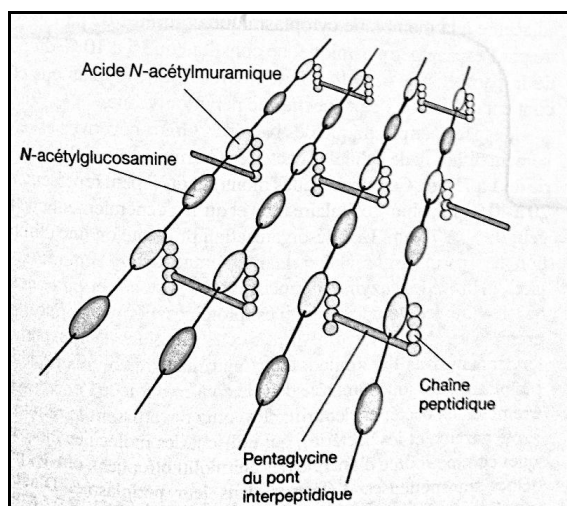
Enveloppe **rigide** assurant l'intégrité de la bactérie. Elle est responsable de la forme des cellules.

Elle **protège** des variations de pression osmotique. Elle est **absente** chez les **Mollicutes**, (*Mycoplasma*).

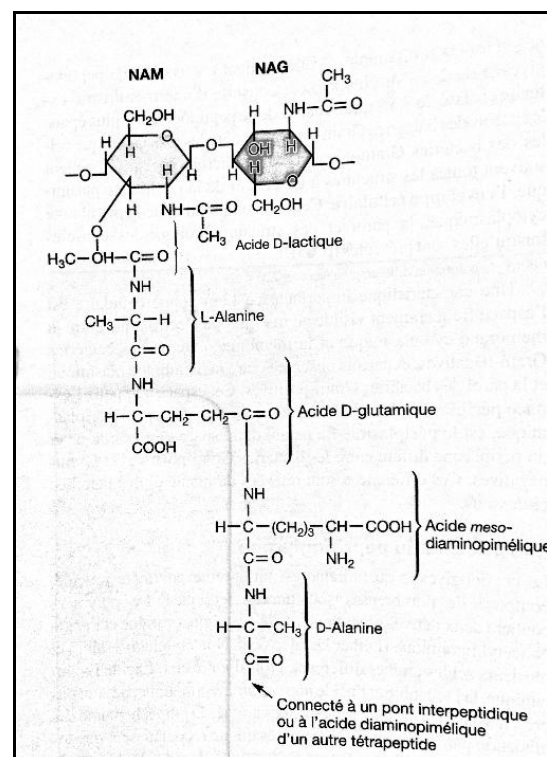
2.3.1 Composition chimique de la paroi

Gram positive	Gram négative
Très peu de lipides (1 à 2 %)	Lipides en grande quantité (10 à 20 %, Membrane externe)
Acides teïchoïques et lipoteïchoïques	Il n y a pas d'acides teïchoïques ou lipoteïchoïques
4 Acides aminés majeurs : Ala (D et L) D-Glu, L-Lys, acide diaminopomélisque (DAP)	Mêmes acides aminés Beaucoup moins de DAP et de L-Lys
Osamines N-acétyl glucosamine (NAG) et Acide N-acétyl muramique (ANAM)	

Principaux constituants chimiques de la paroi



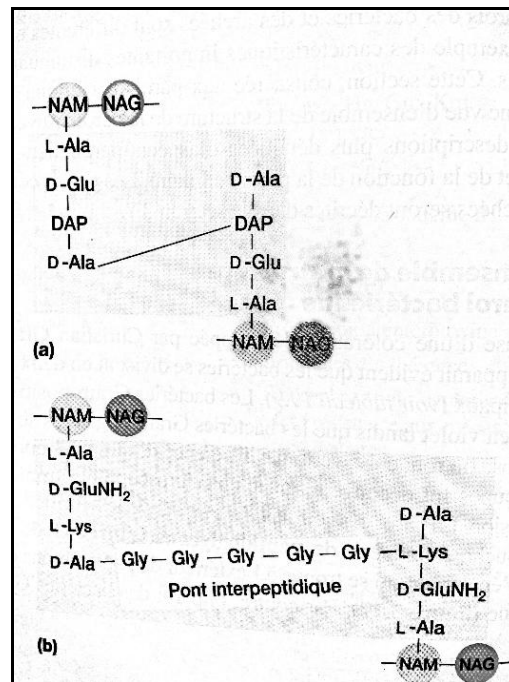
Dessin schématisé du peptidoglycane



La composition des sous unités du peptidoglycane

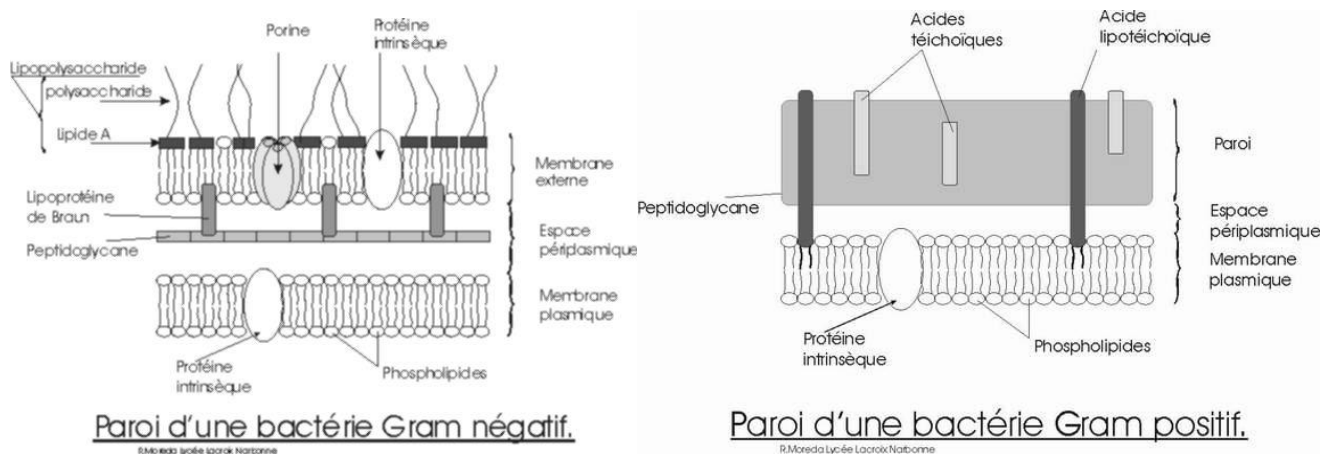
La chaîne polysaccharidique: faite d'une alternance de molécules de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N acétylmuramique (NAM). Les chaînes latérales peptidiques identiques, composés de 4 acides aminés (tétrapeptide), attachées aux NAM.

Chez les Gram positifs, un ensemble de ponts « inter-peptidiques » (pentapeptide) qui partent du 4^e acide aminé du térapeptide vers le 3^e acide aminé du térapeptide d'une seconde chaîne polysaccharidique et ainsi de suite.



Organisation du térapeptide et du pentapeptide a) Gram -, b) Gram +

2.3.2 Structure moléculaire de la paroi des Gram négatives et positives

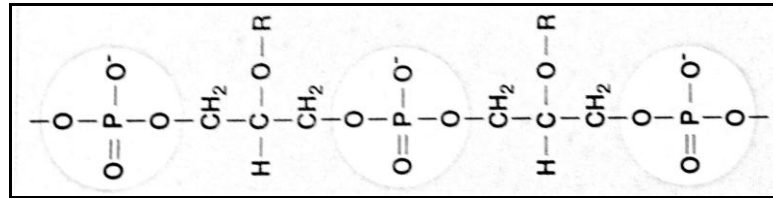


A. Paroi des Gram positifs

Le peptidoglycane est le **constituant majeur** (90%)

Le reste correspond à un feutrage d'acides téichoïques (10%)

Le peptidoglycane est **très solide**, les liaisons croisées entre chaînes glucidiques sont nombreuses. Présence de flagelles.



Structure d'un acide teïchoïques : Phosphate + glycérol + R (Alanine, Glucose...)

B. Paroi des Gram négatifs

Beaucoup plus complexe, elle est constituée **du peptidoglycane et de la membrane externe**. Il y a plusieurs couches :

Peptidoglycane en couche mince.

Phospholipides

Lipopolysaccharides (LPS) : formé de 3 parties :

- **Le lipide (A)** couplé à la glucosamine et à des résidus phosphore qui est amphiphile, possédant une partie hydrophobe et une hydrophile. Il y a analogie entre les appellations « **endotoxine** », « **lipide A** » et « **membrane externe** »
- **Le polysaccharide central**, constitué de 10 sucres.
- **La chaîne latérale O, ou antigène O**, chaîne courte, sa composition varie selon la souche bactérienne.

Le LPS joue plusieurs fonctions, telle que l'**attachement** sur les surfaces, **bloque l'entrée de substances toxiques**. Il agit comme **une endotoxine** (lipide A) qui cause les symptômes des maladies induites par des Gram négatives. On note également la présence de **PORINES** (protéines de passage trimérique) : seules structures de transport des composés hydrophiles, essentielles à la vie de la bactérie comme les monosaccharides, mais aussi à l'action de certains antibiotiques. D'**autres protéines** servent à la captation d'ions (fer), ou de vitamines (facteurs de croissance).

La coloration de Gram : Les différences de constitution et de structure chimique des parois Gram (+) et Gram (-) permettent d'établir le principe de la **coloration élaborée par Christian GRAM** (1884) :

Procédure de la coloration de Gram : Après fixation du frottis on colore avec le **violet de gentiane**. On rince avec de l'eau. On rajoute un fixateur qui est le **Lugol**. On rince avec de l'eau distillée. On procède ensuite à une étape de décoloration par un mélange d'alcool et d'acétone. Ce dernier pénètre dans les bactéries Gram négatives et non dans les bactéries Gram positives dont les pores ont fermés par déshydratation par l'alcool. On rince et on procède à une contre coloration à la safranine. Les Gram positives vont apparaître **violetes** et les Gram négatives **roses**.

2.3.3 Fonctions de la paroi

Afin d'étudier les rôles de la paroi, on utilise un enzyme, le **lysozyme**.

Le lysozyme coupe les liaisons β 1-4 glycosidiques entre le NAG et l'ANAM. Il en résulte une destruction totale du peptidoglycane chez les bactéries Gram(+), et une fragmentation de celui-ci chez les Gram(-) car le peptidoglycane est moins accessible à cause de la membrane externe.

Expérience :

1- On place une souche de *Bacillus subtilis* (bacille Gram+) en **milieu hypotonique** : la bactérie se comporte normalement.

2- Si on ajoute du **lysozyme** à cette suspension, les bactéries gonflent et éclatent.

3- On fait la même expérience en **milieu isotonique**, les bactéries n'éclatent pas en présence de lysozyme, mais elles prennent une forme sphérique appelée : **PROTOPLASTE**. Les protoplastes ne possèdent plus les propriétés antigéniques de la bactérie, ne se divisent plus, ne fixent plus les bactériophages et sont incapables de mobilité.

4- On fait la même expérience avec *Escherichia coli* (bacille Gram-) : en **milieu isotonique + lysozyme**, les bactéries prennent une forme sphérique appelée : **SPHEROPLASTE**. Les sphéroplastes conservent toutes les propriétés initiales de la bactérie.

Rôle 1 de la paroi : assurer le maintien de la forme de la bactérie

Rôle 2 de la paroi : assurer une protection contre la pression osmotique intracellulaire (car forte concentration en métabolites à l'intérieur de la cellule >> l'eau rentre).

Un protoplaste ne possède plus les propriétés antigéniques de la bactérie d'origine. En effet, les **antigènes pariétaux** (de la paroi) :

Chez les Gram(+): **peptidoglycane + acides teïchoïques et lipoteïchoïques + polysaccharide C** (Streptocoques).

Chez les Gram (-) : **les antigènes O du LPS.**

Rôle 3 de la paroi : propriétés antigéniques

L'étude des protoplastes met également en évidence d'autres rôles :

Rôle 4 de la paroi : permettre la fixation des bactériophages. Ils reconnaissent des récepteurs localisés sur le peptidoglycane des Gram(+) ou la membrane externe des Gram(-). Cette propriété est utilisée pour l'identification de certaines bactéries : c'est la **lysotypie**.

Rôle 5 de la paroi: participer à la mobilité. En effet, les flagelles sont implantés dans la membrane cytoplasmique mais ne peuvent pas fonctionner en absence de peptidoglycane (d'où immobilité des protoplastes).

Rôle 6 de la paroi : toxicité. Chez les Gram(-), le LPS est une endotoxine (effet toxique porté par le lipide A) qui peut donner fièvres et lésions.

Rôle 7 de la paroi : perméabilité. La paroi laisse passer de petites molécules comme l'eau, les sels minéraux ou des métabolites simples. Par contre elle est plus ou moins perméable à certains solvants (exemple l'alcool. cf. coloration de Gram).

L'espace périplasmique : Contient des enzymes qui participent à la nutrition (hydrolases) et des protéines qui sont impliquées dans le transport de molécules à l'intérieur de la cellule.

Les Gram (+) excrètent plutôt les enzymes hors de la cellule. Ce sont alors des « **exoenzymes** ». Celles des Gram – sont retenues entre les membranes Interne et Externe.

2.4 La membrane plasmique

2.4.1 Composition Chimique

Elle possède le même type de structure que celle d'une cellule eucaryote (bicouche phospholipidique) mais avec **beaucoup moins de glucides** et **jamais de stérols** (sauf chez les mycoplasmes).

Elle est composée de **60 à 70 % de protéines** et **30 à 40 % de lipides**.

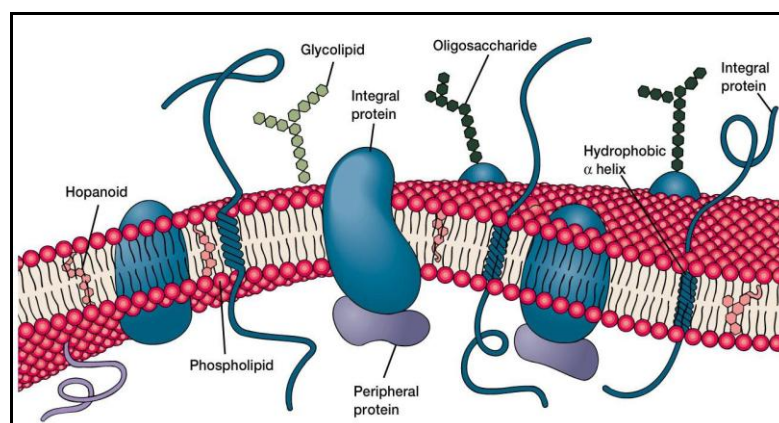
La membrane plasmique contient les enzymes de la **chaîne respiratoire**, les déshydrogénases et les coenzymes associés : NAD⁺, FAD, cytochromes, cytochrome oxydase.

D'autres enzymes impliquées dans la synthèse des lipides et dans la réplication de l'ADN y sont localisées.

2.4.2 Structure de la membrane plasmique

Les lipides sont à la base de la structure de la membrane. Chaque molécule de lipide est amphipathique ; formée d'une partie hydrophobe soluble dans l'huile insoluble dans l'eau et une partie hydrophile ayant des propriétés opposées et portant un groupement phosphate chargé négativement. **Ces deux couches moléculaires induisent une organisation en double feuillet**. Cette organisation n'est pas statique, elle répond au modèle dit en **mosaïque fluide** (Les molécules peuvent se déplacer latéralement en échangeant leurs places).

On distingue deux catégories de protéines : les **protéines périphériques** et les **protéines intégrales** qui traversent complètement le double feuillet.



Structure de la membrane cytoplasmique bactérienne

2.4.3 Fonctions de la membrane plasmique

a-Rôle de barrière semi-perméable (ou semi sélective): elle permet le passage de molécules lipophiles et empêche le passage des molécules hydrophiles.

On distingue 2 grands types de transport :

Le transport passif : il se fait dans le sens du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie.

Le transport actif : il se fait en sens inverse du gradient de concentration des molécules, ce qui nécessite l'utilisation d'énergie (généralement fournie sous forme d'ATP)

b- Site de fixation des flagelles (voir « les flagelles » plus loin)

c- Possède des protéines membranaires ayant pour rôles :

Enzymes responsables de la biosynthèse et de l'excrétion dans l'espace périplasmique de molécules nécessaires à la synthèse de la paroi. Des **Enzymes de la chaîne respiratoire** permettant la synthèse d'ATP et celles de la photosynthèse. Enfin, des **transporteurs** de diverses molécules (ions, sucres, ...) dans les 2 sens.

De plus la membrane joue un rôle important dans la détection des signaux et de composés présents dans le milieu environnant grâce à **la présence de protéines transmembranaires du chimiotactisme**. Ceci, permet aux bactéries dotées de flagelles, **de nager vers les endroits** les plus riches en nutriments, ou bien, de s'éloigner des endroits défavorables comme ceux qui contiennent des substances toxiques. Ces protéines interviennent dans le sens de rotation des flagelles.

2.5 Le cytoplasme

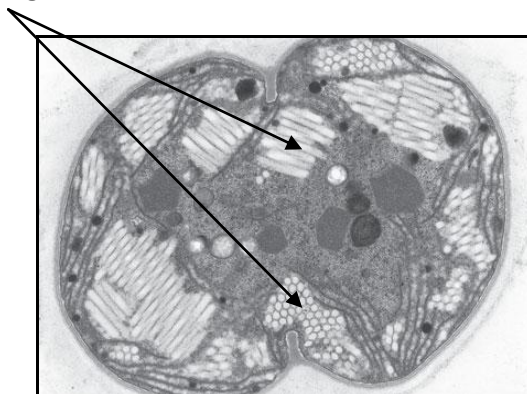
Délimité par la **membrane cytoplasmique**. C'est un sorte de gel à pH neutre contenant de l'eau et :

Des ribosomes: qui interviennent dans la **synthèse des protéines**. Sont associés en chapelets sur l'ARNm sous forme de **polysomes**.

Des substances de réserve = inclusions cytoplasmiques : en général, chaque groupe de bactéries synthétise une seule catégorie de substances de réserve qui forment des agrégats, parfois de grande taille. Cela peut être des **glucides** (amidon et glycogène), des **lipides** (poly-hydroxy-butyrates), **du polyphosphate**, et parfois des **minéraux (fer, soufre)**.

Des organites spécialisés : On trouve des **chromatophores** (organites spécialisés dans la photosynthèse), des **vacuoles à gaz** (permettant aux bactéries aquatiques de flotter à la surface de l'eau).

Vacuoles à gaz



Vacuoles à gaz de cyanobactéries au microscope électronique

2.6 Le Chromosome

2.6.1 Morphologie et structure

La majorité des bactéries possèdent un chromosome unique, circulaire. Par contre, *Vibrio cholerae* en possède deux, un grand de 2,9 millions de bases et un petit de 1 million de bases.

Celui d'*Escherichia coli* est empaqueté et se trouve dans une région qu'on appelle nucléoïde ou corps nucléaire. Il mesure 1400 μm et 300 \AA d'épaisseur.

La morphologie des corps observés est variable selon la phase de croissance et de division de la bactérie. Chez **les cocci**, on observe une petite masse sphérique ou ovoïde, souvent centrale. Chez **les bacilles**, un bâtonnet situé transversalement dans la cellule. Il est généralement mononucléaire chez les cocci et plurinucléaires chez les bacilles. Cet aspect est visible chez les bactéries jeunes en phase exponentielle. L'appareil nucléaire se réplique plusieurs fois avant que la cellule ne se divise.

Cet ADN est associé à des protéines notamment des topoisomérases qui interviennent dans le repliement de la molécule d'ADN, par contre on ne trouve pas d'histones comme chez les eucaryotes. On trouve par contre des polyamines analogues aux histones, tel que la protéine II, riche en Arginine.

2.6.2 Composition

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est un polymère de PM élevé, composé d'unités appelées nucléotides.

Nucléotide : « Groupement phosphoré + sucre à 5 atomes + une base purique ou pyrimidique ».

Bases puriques : Adénine A et Guanine G

Bases pyrimidiques : Cytosine C et Thymine T

Le sucre : Désoxyribose

Le groupement phosphoré : est un phosphate diester en 3' et 5' du désoxyribose

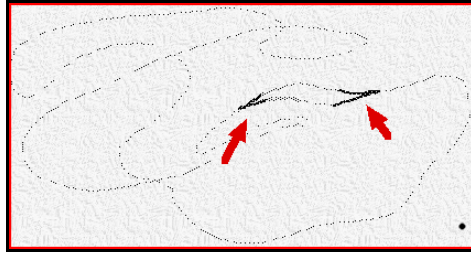
Il y a autant de « A que de T » et autant de « C que G » par contre le rapport (A+T)/(G+C) mieux connu sous le nom de coefficient de Chargaff varie selon les espèces. On l'exprime en GC%. 50% chez *E.coli* 60% chez *Pseudomonas*, 25 à 45% chez *Clostridium*.

2.6.3 Réplication Chimique

L'ADN se réplique, c'est-à-dire qu'il se reproduit lui-même. La séquence sur une chaîne détermine automatiquement la séquence sur l'autre chaîne.

La réplication **est semi-conservative** : Chaque chaîne parentale reste associée à la nouvelle chaîne pour qui elle sert de matrice.

La réplication **est bidirectionnelle** : Cairns a été le premier à observer un chromosome entier d'*E.coli* en cours de réplication. Il a associé des techniques de marquage isotopique et d'autoradiographie, suivie d'observation en microscopie électronique. Après avoir cultivé des bactéries dans un milieu contenant de la thymidine tritiée à faible activité spécifique, pendant un temps dépassant la durée du cycle, il met au point une méthode de lyse de la cellule permettant de libérer l'ADN directement sur une grille de microscopie électronique, en minimisant les risques de cassures mécaniques de la molécule.



La préparation est recouverte d'une émulsion photographique et après exposition et développement, l'examen révèle des grains d'argent le long de la molécule d'ADN. Ces premières observations ont **montré la circularité du chromosome d'*E.coli***. Dans un second temps, Cairns a effectué des marquages plus courts et déduit des images présentée que la réplication commence en un point du chromosome bactérien, **l'origine de la réplication** et fait le tour de celui-ci.

Mécanisme moléculaire de la réplication

Plusieurs enzymes sont impliquées :

ADN polymérase I, II, III : catalysent l'addition de désoxyribonucléotides à l'extrémité d'une chaîne d'ADN, elles ont aussi une activité exonucléasique. La III est la plus active.

ADN ligase : unit les extrémités de deux chaînes d'ADN en catalysant la synthèse d'un pont phosphodiester entre un 3'OH et 5'P. Elle répare les coupures d'ADN et circularise l'ADN bactérien.

Hélicase : Elle ouvre les chaînes d'ADN avant la réplication.

Gyrase ou Topoisomérase II : Le chromosome d'*E.coli* fait 1360 μm ($4 \cdot 10^6$ paires de Nt, donc $4 \cdot 10^5$ tours de spires) si la réplication se fait en 30 min, alors la désenroulement se fait à 10000 Tours/minute. C'est grâce à la découverte de la Gyrase qu'on a pu expliquer ce phénomène.

La **Gyrase** fait une coupure au niveau de l'un des brins, ce qui induit la désenroulement de l'ADN superenroulé en molécule circulaire enroulée.

La réplication débute en un point spécifique (**le point origine ou point d'initiation**).

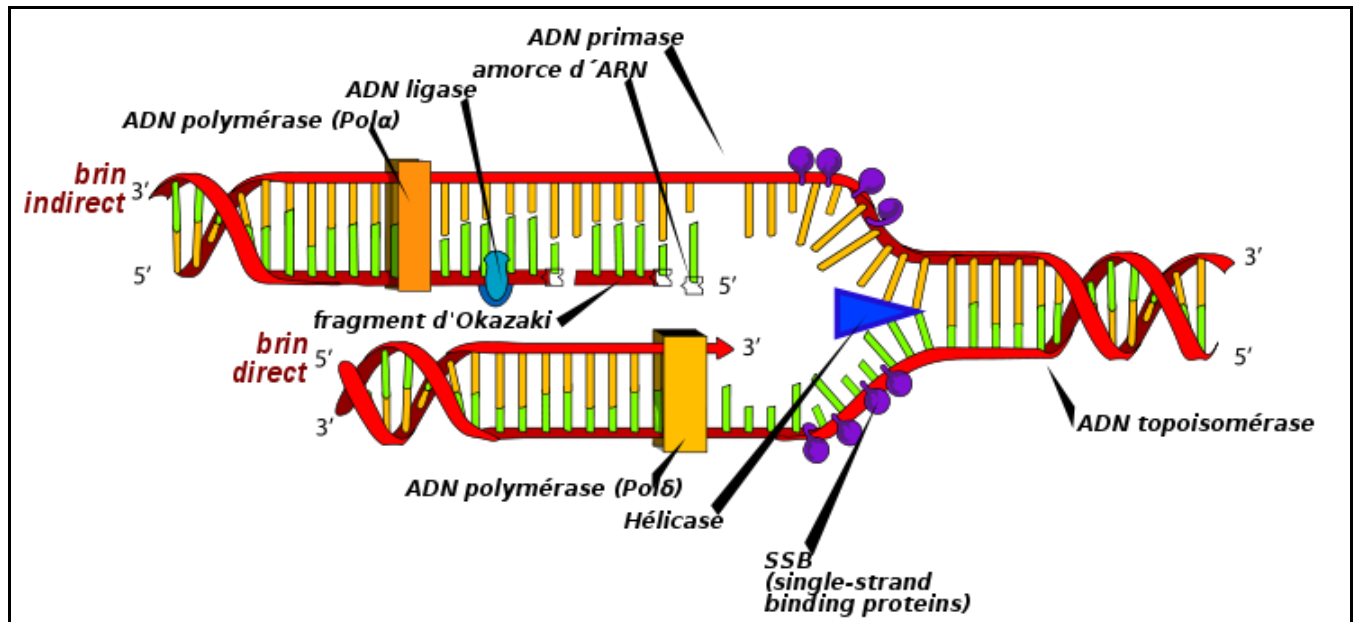
Au niveau de la fourche de réplication, l'un des deux brins est synthétisé dans le sens de déplacement (3'OH libre), catalysé par la DNA polymérase III. Il est **appelé brin précoce ou avancé**. L'autre à extrémité 5' sera synthétisé par **fragments d'Ogasaki** et il est appelé **brin tardif**.

Ces fragments de 1000 à 2000 résidus nécessitent **des amorces d'ARN** synthétisées par une ARN polymérase DNA dépendante appelée **primase**.

Ensuite ces amorces ARN sont excisées par **l'ADN polymérase I** (activité exonucléasique) et les délétions sont remplacées par de l'ADN par cette même enzyme.

Enfin l'ADN ligase relie les différentes séquences au niveau de leurs extrémités 3'OH et 5'OH libre.

Durant toutes ces étapes, les d'ADN matrice sont maintenus déroulés et stabilisés par des protéines appelées « **DNA binding proteins** ».



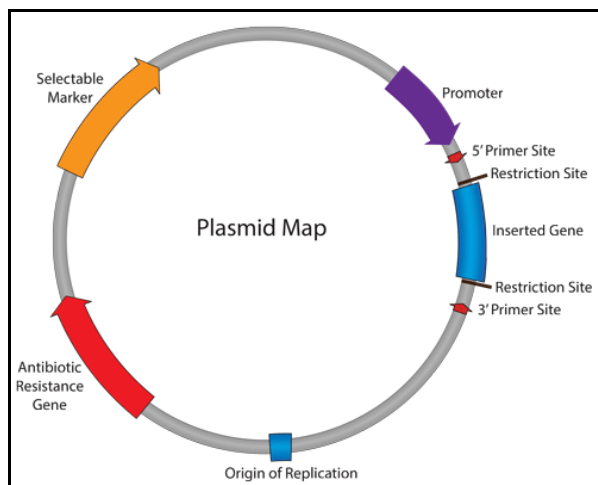
Fourche de réplication de l'ADN chez E. coli. (Mariana Ruiz Villarreal, Humburg Germany)

2.7 Les Plasmides

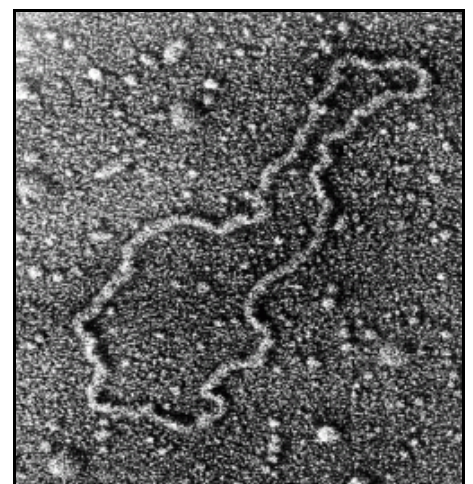
La cellule bactérienne peut contenir des éléments génétiques extra chromosomiques, capables d'autoréplication. On les appelle **plasmides (Lederberg , 1952)**. Certaines bactéries possèdent plusieurs plasmides différents. Les plasmides permettent à la bactérie une meilleure adaptation à son environnement

2.7.1 Structure des plasmides

Ce sont des molécules d'ADN bicaténaire, généralement **circulaires**, mais **il en existe des linéaires**. Parfois ils s'intègrent dans le chromosome et on les appelle des **épisomes**. Ils sont transmissibles aux cours des générations mais pas de façon équitable comme pour le chromosome. La perte d'un plasmide est dite **curage**.



Représentation schématique d'un plasmide commercial
<http://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid>



Plasmide au microscope électronique
 PNAS in November 1973 by Stanley N. Cohen et al

Les plasmides sont généralement de petite taille, (1 kb à 400 kb), 1/100 du chromosome bactérien. Ils portent très peu de gènes, moins de 30. On classe les plasmides selon leur fonction et leur propagation.

On distingue ainsi : des **plasmides conjugatifs**, qui portent le gène responsable de la synthèse des pili sexuels, nécessaires à la conjugaison.

Des **plasmides R** (facteurs de résistances) : ils permettent aux bactéries de résister aux antibiotiques.

Des **plasmides Col** qui codent pour des protéines dites **bactériocines**, telle que la **colicine d'*E.coli***. Les bactériocines donnent un avantage à la bactérie en tuant des souches très proches systématiquement parlant d'*E.coli*.

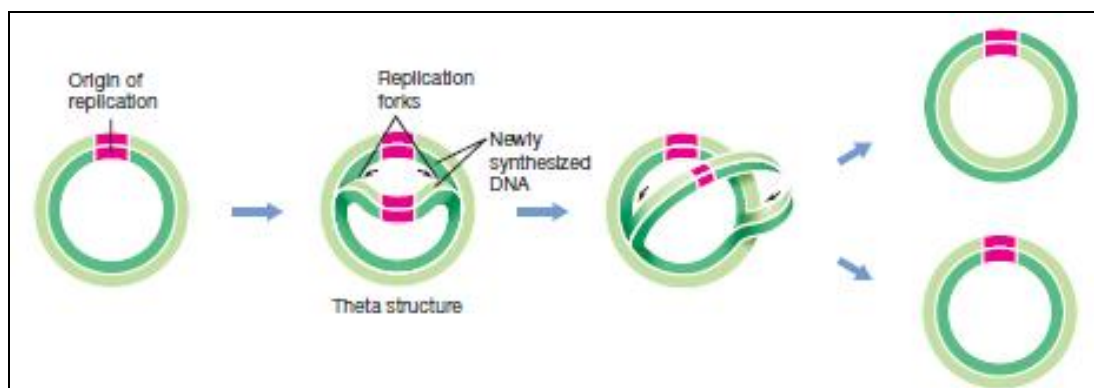
Des **plasmides de virulence** qui codent pour des **toxines** responsables des symptômes causés par des bactéries pathogènes.

Des **Plasmides métaboliques** qui codent pour des enzymes capables de cataboliser des molécules complexes, aromatiques qui polluent notre environnement (pesticides) ou bien des nutriments comme le lactose, citrate de Na, urée. Enfin la fixation de l'azote chez *Rhizobium*.

2.7.2 Réplication

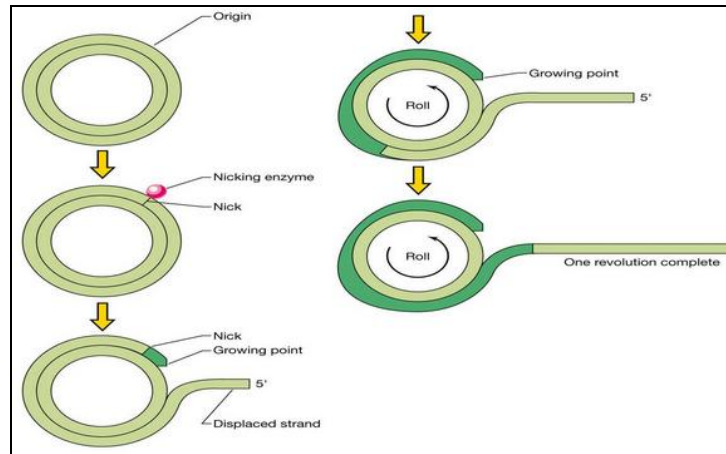
Le plasmide peut se répliquer selon deux modèles :

La réplication de type Theta θ , uni ou bidirectionnelle, à partir d'une origine de réplication en utilisant l'équipement enzymatique de la bactérie hôte.



Réplication de Type Theta θ

Une réplication de type « rolling circle » ou cercle déroulant. Un brin est coupé par une nucléase. Ce brin va se dérouler autour de l'autre brin dans le sens 5'P et la bactérie va synthétiser un brin complémentaire simultanément aux deux brins parents



Réplication de type « Rolling cercle »

2.7.3 Propriétés (voir également les différents types de plasmides ci-dessus)

a) Résistance aux antibiotiques (90% plasmidique) les 10% restant (chromosomique).

b) Résistance aux métaux lourds (mercure, sels de cadmium, bismuth, de plomb, d'antimoine et arsénites).

c) Production de substances à rôle pathogène. L'exemple le plus étudié est rencontré chez les *Escherichia coli*, responsables de diarrhées

d) Le pouvoir pathogène dans les 3 cas est contrôlé par une information génétique **portée par un plasmide**, codant pour des **entérotoxines** et des **facteurs de colonisation** permettant l'attachement des bactéries à la surface de l'intestin (épithélium intestinal).

e) Production de bactériocines

f) Caractères métaboliques : un grand nombre de caractères biochimiques des bactéries sont d'origines plasmidiques.

2.8. Pili

2.8.1. Structure

A ce jour on distingue **4 types de Pili (I, II III et IV)**.

Il est plus juste de nommer les **types I, III, IV** des **fimbriae** et le **type II** un **Pili sexuel**.

Les fimbriae : mot latin, signifie filament ». C'est un appendice court (de l'ordre de 1µm), creux, rigide, composé de protéines disposées en hélice. Il est largement retrouvé en grand nombre autour du corps bactérien (1000) chez les Gram négatives et exceptionnellement chez les Gram positives.

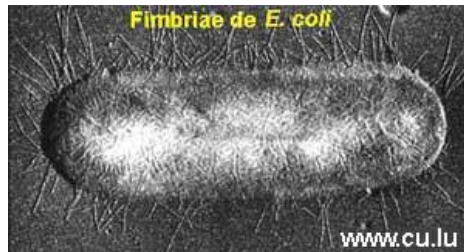
Les pili sexuels ou de type II : Pili en latin signifie cheveu. Ils sont plus longs et plus épais que les fimbriae (10 µm, 9 nm respectivement) et moins nombreux (1 à 4 par cellule). Le gène *pili* est porté par un plasmide conjugatif.

2.8.2 Fonction

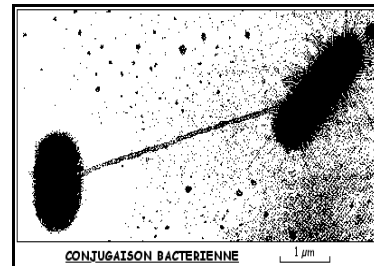
Les fimbriae de type I, III, jouent un rôle dans l'adhésion des bactéries aux différents supports vivant ou non. Ils favorisent la formation de biofilm.

Les fimbriae de type IV, retrouvés par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa*, en plus de l'attachement, ils sont impliqués dans un autre mode de mobilité, dite **saccadée**. On les retrouve au niveau des pôles des cellules bactériennes. Les fimbriae IV se contractent et se rétractent comme un ressort, pour permettre la mobilité de la bactérie.

Le pili sexuel ou de type II: Il a un rôle dans la conjugaison bactérienne (un des 3 modes de transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre). Les pili sexuels de la bactérie donatrice vont permettre de reconnaître une bactérie réceptrice (de l'amarrer) et entraîner la création d'un pont cytoplasmique entre les 2 bactéries, permettant ainsi le passage d'une molécule de plasmide.



Pili sexuel de type II



Fimbriae de type I

2.9. La capsule

2.9.1 Morphologie

Certaines bactéries possèdent des structures entourant la paroi. On distingue en réalité 3 types de couches, **la capsule**, les **couches mucoïde** et la **couche S** selon les bactéries.

La capsule, est bien organisée, bien définie et elle est difficilement détachable de la bactérie.

La couche mucoïde, retrouvée chez les bactéries aquatiques est moins bien organisée, diffuse, elle est facilement détachable de la bactérie.

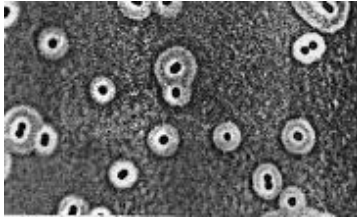
La couche S, plus rigide, très structurée. C'est une couche de surface mise en évidence que par microscopie électronique. Elle est constituée de sous unités protéiques organisées de façon.

Mise en évidence de la capsule

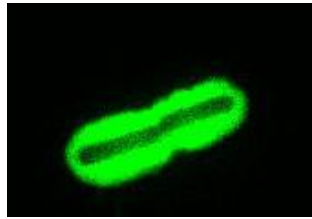
Etat frais à l'encre de chine : les bactéries apparaissent sur fond sombre avec un halo clair autour du corps bactérien qui correspond à la capsule.

Microscopie électronique

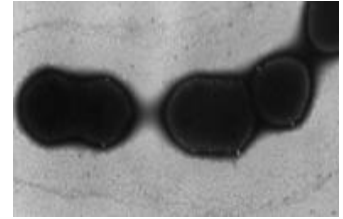
Techniques immunochimiques : des Anticorps anti-capsulaires se fixent sur les Ag capsulaires. Le complexe Ag-Ac précipite et augmente l'épaisseur de la capsule qui devient visible au microscope. Cette réaction est appelée : **Réaction de gonflement de la capsule de NEUFELD**.



Coloration à l'encre de chine



Techniques immunochimiques



Microscopie électronique

2.9.2 Composition chimique

La capsule et les couches mucoïdes peuvent être regroupées sous le terme de **glycocalyx**. Le glycocalyx est un réseau de polysaccharides. *Bacillus anthracis* agent de la maladie du charbon, possède une capsule de nature protéique.

La couche mucoïde est fréquente chez les bactéries aquatiques et particulièrement importante chez les bactéries du genre *Zooglea* qui produisent des masses gluantes. Certains polysides produits par des bactéries **ont un intérêt industriel et sont produits comme gélifiant** notamment en industries alimentaires : *Leuconostoc mesenteroides* produit des dextrans, *Xanthomonas* des xanthanes ...

La couche S est composée de protéines et de glycoprotéines, organisés en pavement.

2.9.3 Fonctions de la capsule

Les bactéries peuvent vivre sans la capsule, mais cette dernière lui confère des avantages grâce à ses rôles :

De protection : contre les Ultraviolets, la dessiccation, les agents physiques et chimiques.

De Virulence (la pathogénicité) : Elle s'oppose à la phagocytose en diminuant l'adhésion de bactéries aux macrophages. Elle exerce un chimiotactisme négatif sur les leucocytes.

Antigénique : les Ag capsulaires sont responsables de la spécificité sérologique (Ag K). A partir de cette propriété, une classification peut être établie (ex : 70 types sérologiques différents chez *Streptococcus pneumoniae*).

La Couche S : Elle est trouvée chez des Archéobactéries (*Methanococcus* par ex) et chez des Bactéries (*Chlamydia*, *Treponema*, *Helicobacter*, *Bacillus Clostridium* ...). La couche S joue un rôle en tant que structure pariétale en plus de la paroi. Elle est impliquée dans l'adhésion, dans la résistance aux protéases des macrophages et dans la protection vis à vis des bactériophages. La couche S sert de filtre excluant aussi bien l'entrée que la sortie des molécules trop grosses.

2.10. Le flagelle

Ce sont des organes locomoteurs spécialisés. Ils sont très rares chez les coques.

2.10.1 Mise en évidence

Indirecte : état frais (bactéries en mouvement) ou en milieu semi-gélosé. Plusieurs facteurs influencent la mobilité tels que l'âge de la culture, la température (*Yersinia sp* est immobile à 37°C et mobile à 22°C)

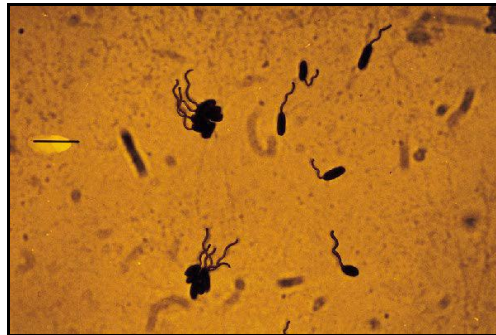
Directe : en **microscopie optique** après avoir épaissi les flagelles par des colorations spéciales (Rhodes, Leifson : fuchsine basique) ; ou en **microscopie électronique**.

Coloration de Rhodes Les flagelles sont fragiles et la préparation du frottis est délicate

Technique : Préparation du frottis (utiliser une lame neuve) : laissez couler, sur lame inclinée à 45° au dessus de la cuve à coloration (mettre de l'eau de Javel dans la cuve), 2 gouttes d'une culture en bouillon (culture jeune : 6 à 12 heures) de la souche à étudier. Laissez sécher.

Recouvrir la préparation de mordant de Rhodes (préparé extemporanément) pendant 3 mn

Laver soigneusement à l'eau distillée. Recouvrir de nitrate d'argent ammoniacal (préparé extemporanément), chauffé presque à ébullition, et laisser agir 3 à 5 mn. Rincer à l'eau distillée à l'eau distillée. Sécher et observer à l'immersion.



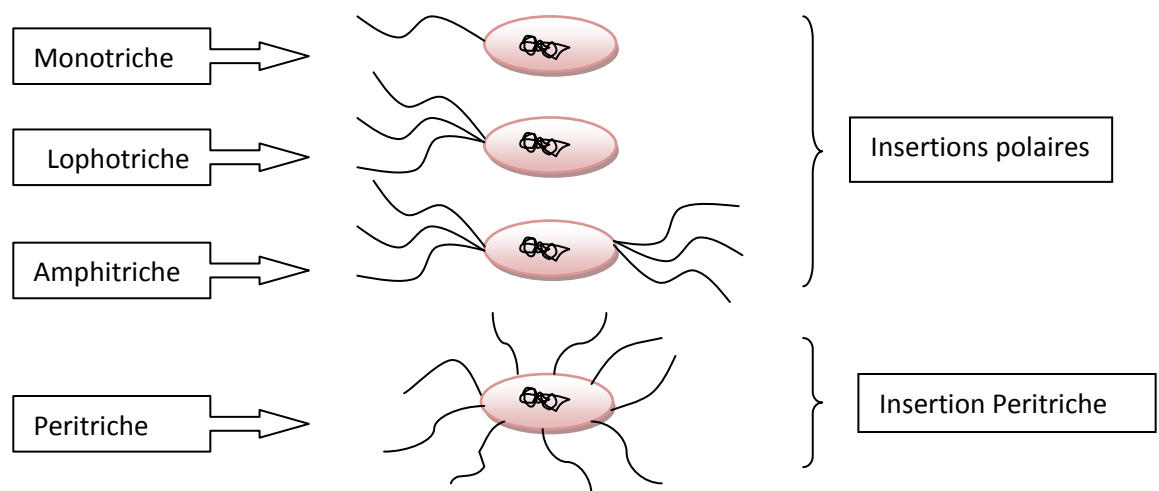
Pseudomonas fluorescens (flagelle monotriche)

Coloration selon la méthode de Rhodes

2.10.2 Structure

Ils mesurent en moyenne 16 à 20 μm (beaucoup plus que la bactérie) et sont très fins (300 Å d'épaisseur).

Il existe différents modes d'insertion des flagelles, selon le nombre et la position de ceux-ci :



Types flagellaires et modes d'insertion

Ils sont fixés à la bactérie par insertion **dans la membrane cytoplasmique**.

Ils sont mobiles par rotation, **comme une hélice**, grâce à un mécanisme similaire à un « **rotor** » fonctionnant grâce à l'énergie fournie par un gradient de protons.

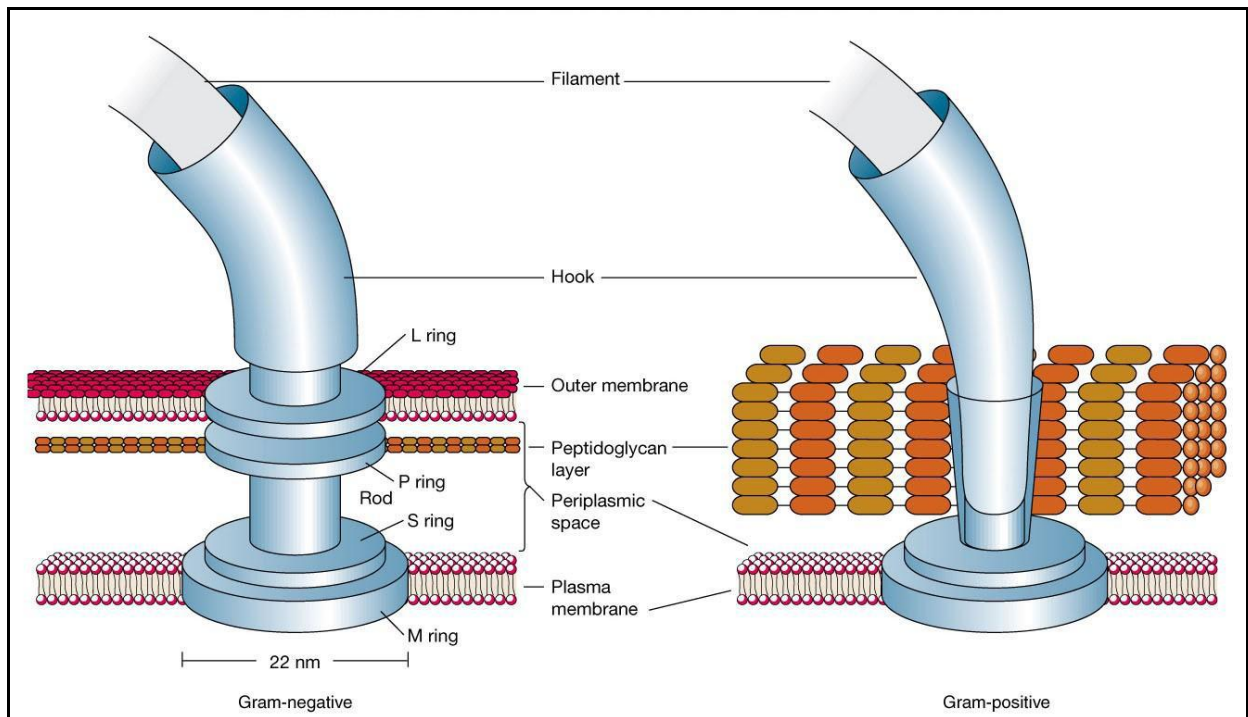
Le mécanisme de rotation s'effectue grâce à un complexe mécanisme impliquant des récepteurs et des kinases situé dans la membrane plasmique et impliquant aussi la paroi.

Architecture moléculaire : Le flagelle bactérien est constitué de **3 parties** :

Le filament hélicoïdal

Le crochet

Le corpuscule basal



Structure du flagelle de bactéries Gram négatives et positives

Le filament

C'est un **cylindre creux** constitué d'une seule protéine multimérique : **la flagelline**

La flagelline, **protéine fibreuse**, se positionne en hélice rigide qui tourne à la manière de l'hélice d'un bateau.

Le crochet

Il lie le filament au corpuscule basal.

Il a la **même composition que le filament**, mais à cet endroit, la flagelline ne possède **pas le même pas d'hélice**, ce qui permet la **formation d'un coude**.

Le crochet est **plus court** que le filament, mais **plus large**. **Très flexible**, il permet d'induire le mouvement de la bactérie.

La liaison du **crochet au filament** est assurée par des « **protéines associées au crochet** » = protéines **HAP** (« Hook Associated Proteins »).

Le corpuscule basal

Enfoui dans la cellule, il insère le flagelle dans le corps cellulaire. Son architecture, assez complexe, peut être simplifiée en **3 parties** :

Une partie mobile = **le rotor**.

Une partie fixe = **le stator**.

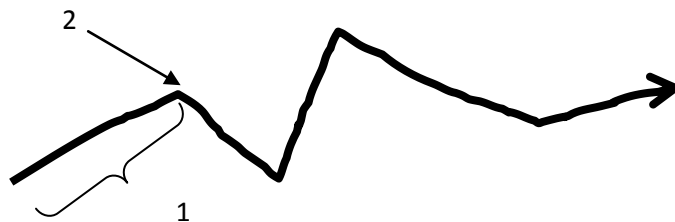
Un inverseur qui déclenche le mouvement soit dans le sens des aiguilles d'une montre soit dans le sens inverse.

Sa **composition est différente** chez les bactéries Gram (+) et Gram (-).

20 à 30 gènes sont impliqués dans la synthèse des flagelles. La synthèse du flagelle se fait par un **assemblage séquentiel** des différents composants : disques, du corps basal, puis du crochet et enfin du filament.

C'est une **force « proton motrice »** qui est responsable de la rotation (mécanisme pas totalement élucidé). C'est-à-dire qu'un **gradient de protons** se dispersant au travers des 2 anneaux fournit l'énergie nécessaire à la rotation.

L'ATP ne semble pas être impliquée dans la rotation du flagelle. Selon le sens de rotation du flagelle, la bactérie ne se comporte pas de la même manière :



1 : Dans le **sens inverse des aiguilles d'une montre (CCW)**, la bactérie **avance** en tournant légèrement sur elle-même

2 : Dans le **sens des aiguilles d'une montre (CW)**, la bactérie **culbute** et change alors de direction pour repartir en avant avec les flagelles tournant CCW.

Remarque : pour les ciliatures **péritriches** : En mouvement, tous les flagelles sont regroupés à l'arrière du corps bactérien (comme les tentacules d'un calamar). Pour changer de direction, les flagelles se dispersent autour du corps bactérien et la bactérie culbute.

2.10.3 Fonctions du flagelle

La locomotion

Mises en évidence sur des **milieux semi-gélosés** (diffusion dans la gélose) ou sur **milieu solide** (envahissement de la surface de la boîte. Ex : *Proteus*).

Rôle antigénique

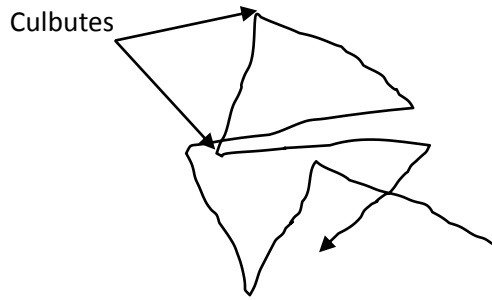
Les **antigènes flagellaires (Ag H)** déterminent différents sérotypes (exemple : sérotypage des *Salmonella*). En présence de l'anticorps correspondant à leur Ag H, les bactéries agglutinent et les bactéries s'immobilisent. La **spécificité antigénique** repose sur le **nombre et la séquence des acides aminés** de la flagelline.

Fixation des bactériophages

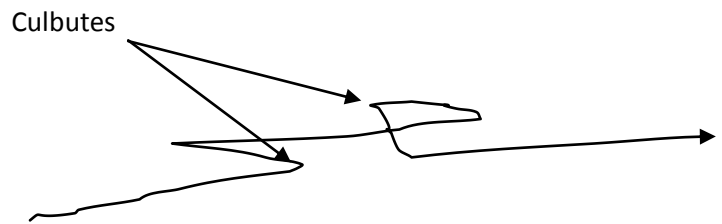
Les flagelles sont le **lieu de fixation de certains bactériophages**.

Le chimiotactisme

Certaines substances attirent les bactéries mobiles, d'autres les repoussent. Selon la composition du milieu de culture, on distingue **2 types de trajectoires** :



Les mouvements sont aléatoires. Il y a de nombreuses culbutes. Aucune direction claire ne se dégage, en absence de gradient, le milieu de culture est dit **neutre**.

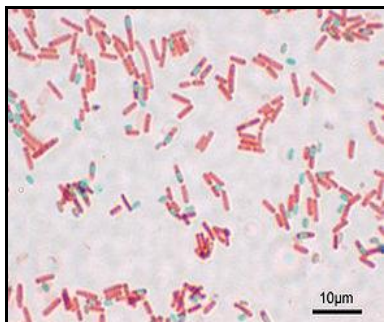


Les **distances sont plus longues**, il y a moins de **culbutes**. Une **direction claire** apparaît en fonction d'un **gradient de substances attractives ou répulsives**.

2.11. La spore

Ce sont des **structures de résistance** formées par certaines bactéries lorsque les **conditions deviennent défavorables**. Elle permet aux bactéries sporulantes de survivre dans des conditions difficiles et extrêmes de l'environnement. Les **genres bactériens** les plus connues qui forment des **endospores** sont **Bacillus**, **Clostridium**, **Sporosarcina**. Ce sont toutes des bactéries Gram (+). D'autres genres sont capables également de sporuler.

Mise en évidence : Les spores sont visibles à la **coloration de Gram** où elles apparaissent comme des espaces vides à l'intérieur des bactéries : seul le contour de la spore apparaît coloré. A l'**état frais**, elles apparaissent comme de petites masses réfringentes au sein de la bactérie, ou libres dans le milieu. Il existe des colorations spéciales basées sur le **caractère acido-alcool-résistant** des spores. Exemple : **coloration au vert de malachite** = **coloration de Benito-Trujillo**. Après une contre coloration par la fushine, les spores apparaissent **vertes** dans la bactérie **rose**.

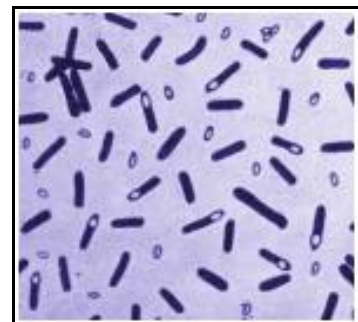


Coloration au vert de malachite

Bacillus



Coloration de Gram

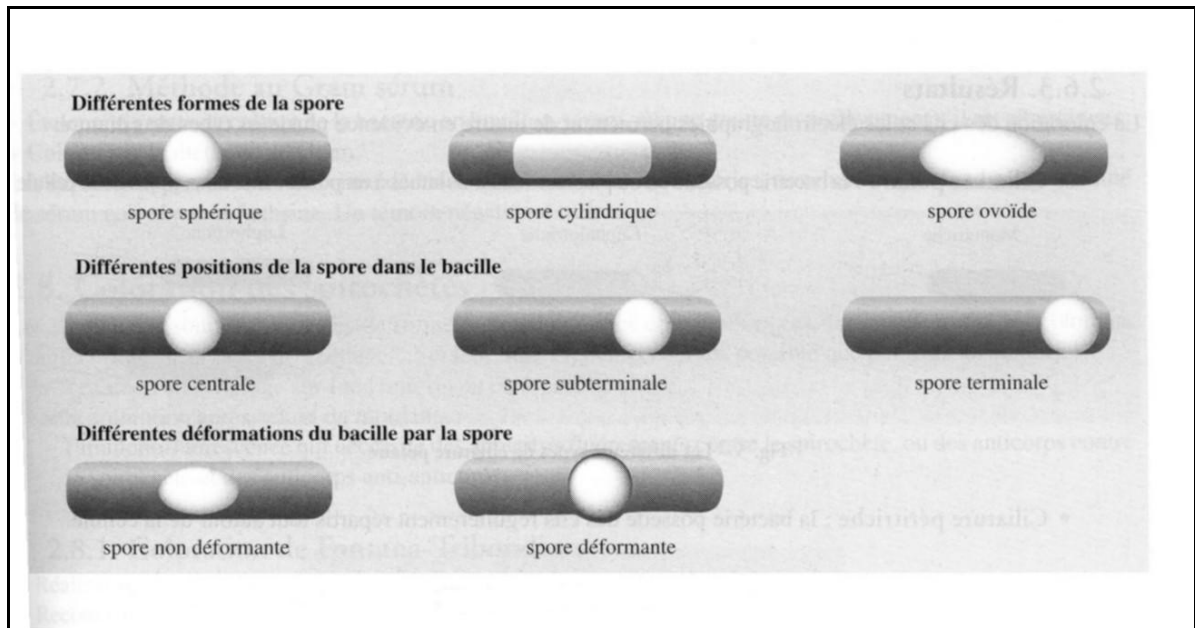


Coloration de Gram

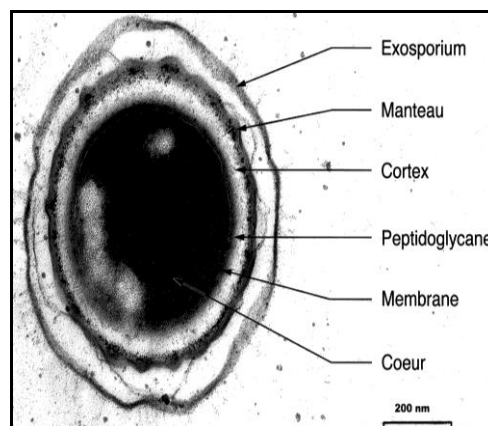
Clostridium

2.11.1 Morphologie

Les spores sont de petites unités **ovales ou sphériques**. Elles peuvent **déformer ou non** le corps bactérien. Leur **position** dans la cellule est variable : centrale, terminale, subterminale. Elles servent également dans l'identification bactérienne. La spore peut-être **libre ou non**. La recherche de tous ces caractères se fait dans un **but taxonomique**.



2.11.2 Structure



Structure d'un endospore de *Bacillus anthracis* (x 150000)

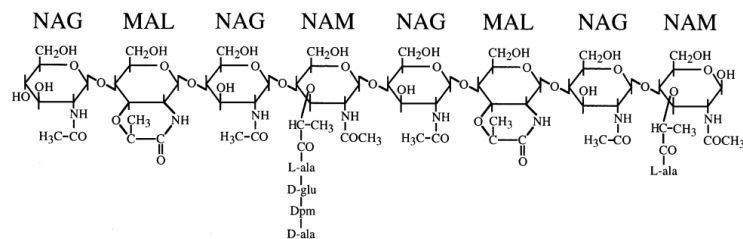
La spore possède **une paroi et une membrane plasmique** identiques à celle de la cellule végétative. L'enveloppe la plus externe est mince, appelée **exosporium**. Sous l'exosporium on trouve **le manteau ou la tunique**, composée de plusieurs feuillets protéiques. **Le cortex** est localisé juste sous la tunique. Enfin le **protoplaste** (cytoplasme) ou cœur de la spore, contient les ribosomes, le nucleoïde et des enzymes inactives.

Composition chimique

L'**exopori**um de *Bacillus anthracis* par exemple est composée de protéines, d'osamines et de polysaccharides neutres. Elle contient une multitude d'enzymes nécessaires à la germination et/ou à l'interaction avec les cellules de l'hôte tels que les macrophages.

La **tunique** est de nature protéique et selon l'espèce elle est constituée de protéines **ressemblant à la kératine** chez *Bacillus cerus* ou **au collagène** chez *Bacillus subtilis*. Elle contient également les enzymes nécessaires à la germination.

Le **cortex** est constitué de peptidoglycane différent de celui de la paroi avec moins de ponts interpeptidiques car 50% de NAM (acide N-acetyl muramique) sont remplacés par **des MAL (résidus lactam-muramique)**



Popham, D and al; JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 1996, p. 6451–6458

Le **protoplaste** pauvre en eau, contenant des enzymes inertes et du dipicolinate de Calcium qui stabiliserait l'ADN chromosomique de la spore. Il contient également d'autres protéines acides qui se fixent en grandes concentration sur l'ADN pour également le protéger. On trouve également des enzymes de la réparation de l'ADN lors de la germination.

2.11.3 Phénomène de sporulation

Des conditions défavorables de croissance entraînent la sporulation ou l'absence de germination de la spore. Il représente le passage de la forme végétative à la forme sporulée. La sporulation dure environ **10.5 heures**, chez *Bacillus megaterium*

Elle est provoquée par l'épuisement du milieu en substrat nutritif et elle peut nécessiter des conditions particulières : **absence d'oxygène** pour les Clostridium, **présence d'oxygène** au contraire pour *B. anthracis*. Le processus de sporulation débute à la fin de la phase exponentielle et se déroule en 6 étapes :

Stade I formation du filament axial : la division nucléaire n'étant pas suivie d'une division cellulaire, les deux génomes fusionnent donnant un filament chromatique axial.

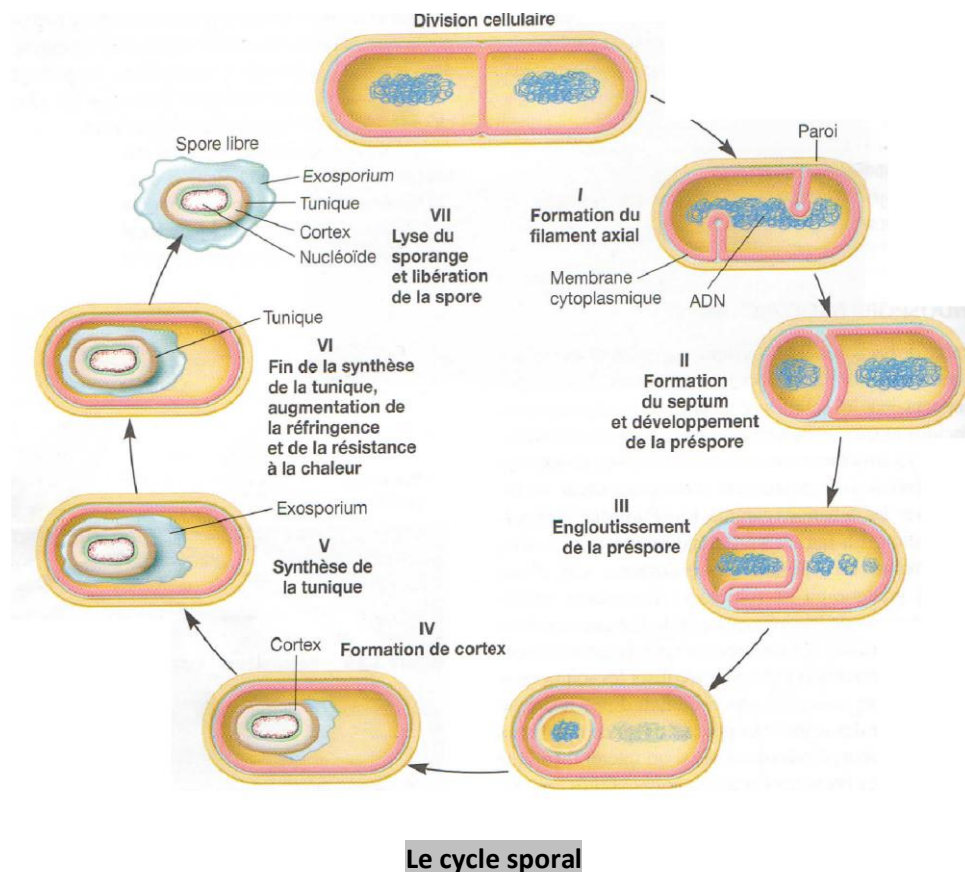
Stade II : les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales. Ce septum va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une préspore caractéristique.

Stade III : Engloutissement de la préspore.

Stade IV : entre les deux membranes limitant la préspore se forme la paroi sporale puis apparaît rapidement le cortex.

Stades V and VI : apparition des tuniques et après maturation.

Stade VII : la cellule végétative se lyse et libère la spore.



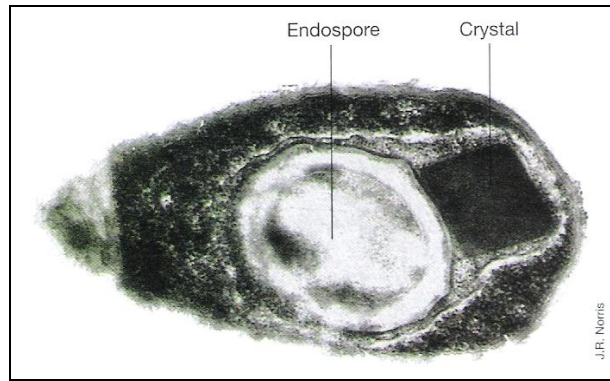
2.11.4 Propriétés

La spore possède de nouvelles propriétés par rapport à la cellule végétative :

Dans la nature (conditions naturelles), la spore permet de résister au manques d'eau et de nutriments.

Expérimentalement on a démontré les propriétés suivantes :

- **La thermo résistance** : La spore résiste en général à des températures de **70-80°C pendant 10 minutes**, parfois plus. Cette propriété est due à la présence de **l'acide dipicolinique**, la **déshydratation de la spore** et aux **protéines « SASP » (petites protéines acides et solubles pouvant se fixer à l'ADN)**.
- **Résistance aux agents physiques et chimiques** : La spore résiste aux rayons Ultraviolets, aux rayons gamma (Calcium, et SASP). Aux antiseptiques, désinfectants, antibiotiques (la tunique).
- **Synthèse d'antibiotiques** : Certaines bactéries synthétisent des antibiotiques au début de la phase de sporulation. **Exemple** : *Bacillus licheniformis* synthétise ainsi la **Bacitracine** ; *Bacillus polymyxa* le **polymyxine**. Mais aussi **des toxines** (entérotoxine de *Clostridium perfringens*) ou des substances à activité biopesticide (toxines qui tue des insectes), **le corps parasporal** de *Bacillus thuringiensis* et de *Bacillus sphaericus*. C'est un cristal protéique, lorsqu'il est ingéré par les insectes, il se dissout dans l'intestin et détruit l'épithélium. Les peptides clivés par les protéases passent dans le sang et provoque la paralysie, suivie de la mort de l'insecte.



Le cristal parasporal d'un pathogène d'insecte (*Bacillus thuringiensis*)

2.11.5 Germination

Afin que la spore **germe**, elle doit se trouver dans des **conditions favorables** : eau, nutriments, pH, force ionique, température convenable, aucun d'agent antimicrobien.

Placée dans des conditions favorables (eau glucose acides aminés) la spore redonne naissance à une cellule végétative. On distingue 3 stades dans le processus de germination :

L'activation : correspondant à une lésion des enveloppes sporales par des agents physiques (choc thermique) ou chimiques (acides, lysozyme) ou mécaniques (abrasion, choc). Remarque : l'activation thermique est mise à profit au cours de la tyndallisation qui consiste à chauffer 3 fois le produit à stériliser : 30 min à 60°C (destruction des formes végétatives et induction de la germination d'éventuelles spores), le deuxième chauffage à 60°C et pendant 30 minutes, tue les spores issues de la germination et induit la germination des spores résiduelles. Le troisième chauffage dans les mêmes conditions, détruit les dernières formes végétatives.

L'initiation débute en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites effecteurs (alanine, magnésium, adénosine) qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées. Des enzymes hydrolytiques dégradent les constituants de la spore ; il y a libération du dipicolinate de calcium. Le cortex ainsi détruit, la spore s'imbibe d'eau et gonfle.

L'émergence de la nouvelle cellule végétative, grâce à l'altération des enveloppes.

Chapitre 3 : Classification bactérienne

Introduction

La science des règles de la classification s'appelle **taxinomie**. Du grec *taxis*, qui veut dire ordre et *-nomie* qui signifie lois. La taxinomie permet de nommer les organismes vivants (**la nomenclature**) et de les classer en unités (**taxons**), au sein desquels, ils partagent un grand nombre de caractéristiques communes.

En microbiologie, cela nous permet d'identifier (**l'identification**) les micro-organismes pour mieux les utiliser ou les exploiter (ceux qui sont bénéfiques) ou bien pour mieux s'en protéger et de les contrôler (ceux qui sont pathogènes).

La taxinomie microbienne **est en perpétuelle évolution**. Chaque année, de nouvelles espèces sont découvertes. A l'heure actuelle, on connaît à peine 10 à 15% des micro-organismes existant. Le reste est à découvrir. Ce constat est dû à notre **incapacité de les isoler** et de les cultiver. L'obtention d'une culture pure est nécessaire pour toute étude taxinomique au sens large, ou plus simplement pour toute identification d'un agent infectieux.

Une confusion existe entre taxinomie et **systématique**. La systématique étudie la diversité biologique et permet de classer, d'organiser les taxons dans un ordre logique.

Enfin, on doit définir la phylogénie, comme l'étude de l'histoire évolutive d'un groupe d'organisme à partir d'un ancêtre commun. Elle permet de regrouper les organismes selon leurs liens de parenté.

La nomenclature est l'ensemble des règles qui permettent de donner un nom stable à chaque taxon et de réglementer la façon de faire (code international de nomenclature des bactéries).

On distingue deux catégories de noms : **Les noms informels, noms spécialisés et les noms scientifiques des taxons**

Par exemple : **Colibacille** = nom informel - ***E.coli* O157**, nom spécialisé. On parlera de l'espèce ***E. coli*** du genre ***Escherichia*** de la famille des ***Enterobacteriaceae***.

Les noms scientifiques sont des mots latins.

Règles de formation des noms : On utilise le **système binomial** du botaniste suédois **Carl Von Linné**.

La première partie du nom est le nom du Genre, la seconde partie est celui de l'espèce.

Le genre : écrit en Italique. Avec sa première lettre en **majuscule**. Après sa citation le nom du genre est abrégé à sa première lettre.

L'espèce : écrite en Italique (ou souligné dans les livres et manuscrits). Avec sa première lettre en minuscule.

La famille : Le nom est fondé sur un genre valide, il est féminin, pluriel et se termine par **-aceae**.

Les principaux taxons par ordre décroissant (hiérarchie taxinomique)

Domaine	Bacteria
Règne	non défini
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i> (ensemble d'espèces)
Espèce	<i>Escherichia coli</i> , <i>E. coli</i> (ensemble de souches)

« Il ne faut pas confondre classification et identification des micro-organismes. Une étude de classification permet de sélectionner une liste de caractéristique et une approche qui facilitera l'identification. Les techniques d'identification sont plus simples et rapide à faire au laboratoire, comparées aux méthodes de classification ».

Plusieurs méthodes ont été développées pour la classification et l'identification des micro-organismes. On distingue, les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques

3.1. Classification phénotypique

Depuis la classification proposée par Cohn en 1872 et jusqu'au début des années soixante, toute la taxonomie bactérienne reposait sur une classification phénétique.

La classification phénétique (ou phénotypique) utilise un nombre de caractères considérés comme importants :

Observations macroscopiques, microscopiques et caractères tinctoriaux :

Descriptions des **colonies** (forme, taille, couleur, odeur) ; **la morphologie des cellules** (bacille, coque) ; leurs **arrangements**. **Les colorations** (Gram, bleu méthylène, acido-alcool-résistante). Observation de **la mobilité** à l'état frais. On peut également rechercher la présence **d'endospores**, la croissance **aérobie, anaérobie**.

Les caractères morphologiques sont utiles pour l'identification, mais ne peuvent pas démontrer à eux seuls les relations phylogénétiques.

-Les Tests métaboliques :

Très importants, ils peuvent distinguer des bactéries très apparentées. On recherche la présence d'enzymes (oxydase, catalase), la dégradation de l'urée, de l'esculine. La transformation du lactose et la production de gaz, l'utilisation de différents sucres comme source de carbone, l'utilisation du citrate, la production d'acétone.

Ces techniques ont été miniaturisées dans des galeries spécialisées (API) , on peut faire 20 tests sur une même galerie spécifique des entérobactéries.



Tests métaboliques en mini galerie API

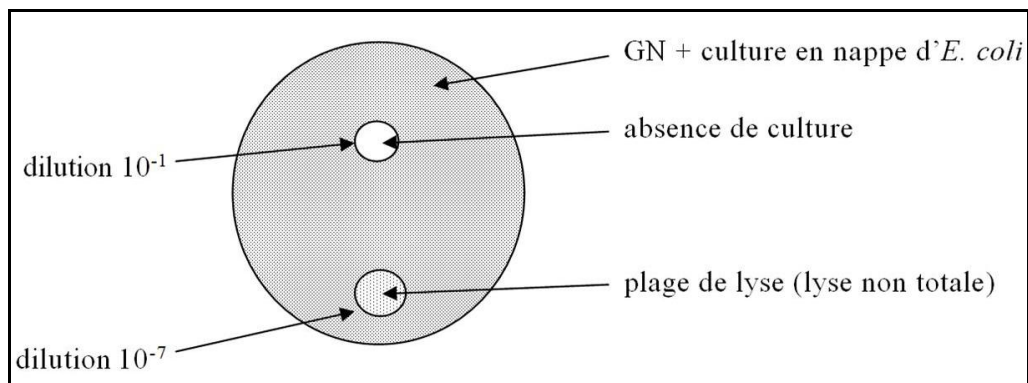
-**La méthode sérologique** : Le sérodiagnostic et le stéréotypage est basé sur la réaction spécifique **antigène – anticorps**. Cette méthode permet de différencier des espèces et même des souches au sein d'une même espèce. Les antigènes ciblés sont les Ag O chez les Gram négatives, les Ag H flagellaires et les Ag K capsulaires.

-**Les tests d'inhibition** : On évalue la croissance des micro-organismes sur des milieux sélectifs, en présence d'antibiotiques (**antibiogramme**).

-**La chimiotaxonomie** : On détermine le profil **des acides gras des parois**. Le Profil **des protéines totales** par électrophorèse (séparation selon le pHi et le poids moléculaire).

-**La lysotypie** : Infection par des bactériophages et formation de plages de lyses.

On définit le **lysovar** ou le **lysotype**.



Lysotypie d'*E.coli* par un bactériophage (absence de culture signifie une lyse).

Pour construire une classification avec ces caractères phénotypiques, il faut donner un poids ou une valeur.

Cette approche a été appliquée aux bactéries en 1957 par Sneath. Cette approche est appelée taxinomie numérique.

Une bonne étude de taxinomie numérique doit contenir, en plus des isolats inconnus, **des souches sauvages** et des **souches types de collections**.

Le nombre de caractère analysés doit être compris entre 50 et 100 au mieux. Le résultat sera codé en code binaire pour chaque test (0 ou 1).

0 = test négatif ou absent &

1= test positif ou présent

Il faut bien sélectionner les tests, (enlever les tests toujours positifs ou négatifs, les tests redondants comme mobilité et présence de flagelle).

L'analyse se fait par un programme informatique (**programme d'agrégation** ou « **Cluster analysis** ». Il évalue la ressemblance entre les souches en calculant l'**indice numérique**, l'**indice de Jacquard**.

Mesure de l'affinité entre les souches

L'indice de Jacquard : $SAB = (nS^+ / (nS^+ + nd)) \times 100$

SAB = Coefficient de similitude entre les souches A et B.

nS^+ = Nombre de caractère semblables

nd = nombre de caractères différents

Ici seuls interviennent les similitudes entre caractères positifs, les négatifs ne sont pas pris en considération.

On peut calculer l'indice de pseudo-distance $d = 1 - S$.

« Cet indice sera autant plus petit que la similitude est grande ».

Méthodes de classification et représentation graphique

Les méthodes de classification opèrent par division ou agglomération. Dans le second cas on regroupe les individus sur la base de leurs affinités en se référant à l'indice de ressemblance (Similitude ou distance). On abouti à des groupes, ou taxons, polythétiques (construits avec des caractères nombreux). On hiérarchise ces groupements par des niveaux de ressemblance.

1^{er} niveau : organismes très semblables. Niveaux suivants : ressemblance moins grandes

Au niveau hiérarchique le plus élevé : Tous les individus sont réunis dans un seul groupe.

Les groupes taxonomiques ou phénons, peuvent être représentés par une matrice de similitude à double entrée (méthode de Sneath) : **Exemple 1** : résultats de tests phénotypiques pour 8 souches, de A à H.

Tests	A	B	C	D	E	F	G	H
1	+	-	+	+	+	+	-	+
2	-	+	+	-	+	-	+	+
3	+	+	-	+	-	+	+	+
4	+	-	-	-	+	+	-	+
5	+	-	-	+	+	+	-	-
6	+	+	-	+	-	-	+	-
7	-	+	+	+	+	-	-	+
8	+	-	-	+	-	+	+	-
9	+	-	+	+	+	+	-	+
10	-	+	+	-	+	-	+	+

L'indice de similarité est calculé en comparant chaque souche avec les autres souches

Souches	A	B	C	D	E	F	G	H
A	100							
B	20	100						
C	20	43	100					
D	75	33	33	100				
E	40	38	71	40	100			
F	86	10	22	63	44	100		
G	33	67	25	33	20	22	100	
H	40	50	71	40	75	44	33	100

Analyse par le programme et regroupement des souches selon leurs indices de similitudes

Souches	A	F	D	E	H	C	G	B
A	100							
F	86	100						
D	75	63	100					
E	40	40	40	100				
H	40	44	40	75	100			
C	20	22	33	71	71	100		
G	33	22	33	20	33	25	100	
B	20	10	33	38	50	43	67	100

Conclusions :

Les souches A, F et D semblent former un seul groupe et appartiendraient à la même espèce.

Les souches E, H et C probablement aussi, mais à une autre espèce différente de (A, F et D).

Les souches G et B nécessitent des tests complémentaires pour pouvoir se prononcer.

La méthode récente, représente les résultats sous la forme de **dendrogramme ou cladogramme (clado=branche)**. Chaque point d'intersection de deux branches correspond à des caractéristiques communes aux espèces situées après ce nœud.

Le dendrogramme est figurée par un arbre à plusieurs branches et rameaux représentant les souches. Les % de similitude permettent de couper cet arbre en des niveaux calculés mathématiquement, donnant naissance aux taxons.

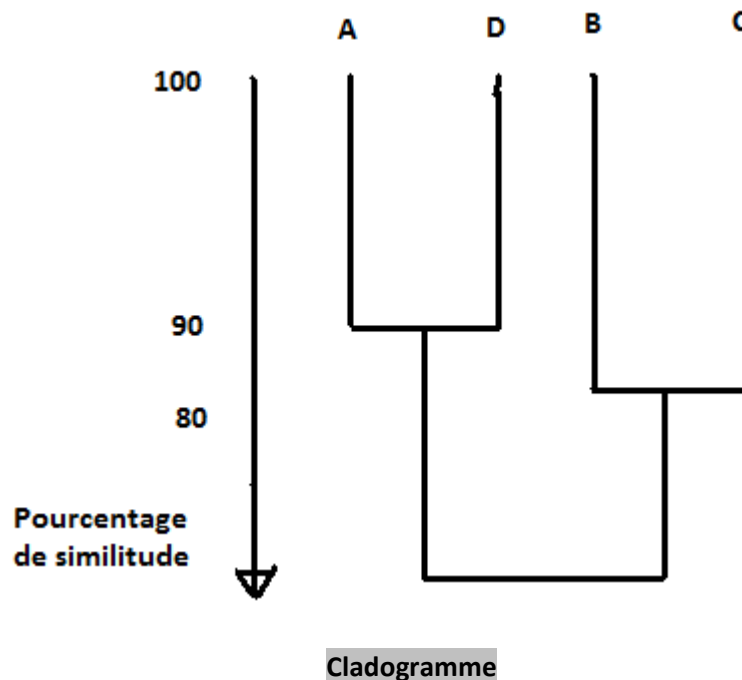
Exemple 2 :

Soit 4 souches A, B, C et D qui présentent des % de Similitudes (% S)

A : D 90 %	B : C 80 %
A : B 50 %	A : C 30%
B : D 20 %	C : D 5 %

La construction de dendrogramme se fera de la manière suivante :

1. Positionnement du couple (A : D) le % S le plus élevé
2. Positionnement du couple B : C
3. Agrégations des deux premiers couples A : D et B : C à un niveau hiérarchique qui constitue la moyenne des valeurs de similitudes pour les autres combinaisons , A : B , A : C, B : D et C : D, soit : $(50 + 30 + 20 + 5)/4 = 26.25$
4. Le résultat obtenu est une hiérarchie que l'on peut représenter par un cladogramme.



Limites de la classification phénotypique

Techniques non adaptée au diagnostic des bactéries dont la culture est lente ou difficile (*Chlamidia*, *Rickettsiae*...) ou aux germes que l'on ne sait pas cultiver. **Il faut disposer d'une culture pure.**

Même en multipliant le nombre de tests (400 tests) on n'évalue que 5 à 20 % du potentiel génétique d'une bactérie (*E. coli* possède 3000 gènes)

Il existe des variations intra espèce.

Les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN bactérien permettent des comparaisons plus fines et précises entre les bactéries et une classification plus juste

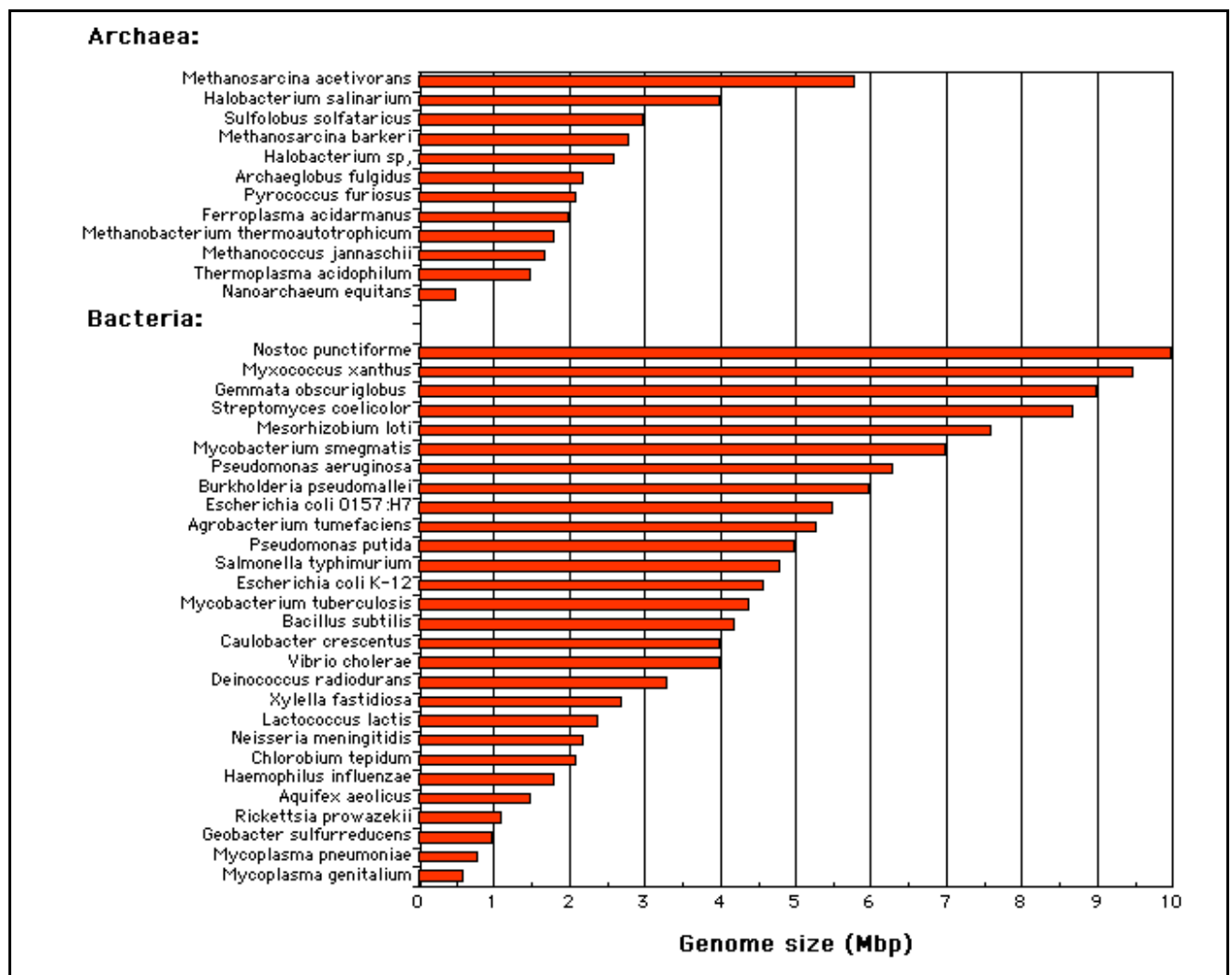
3.2. Taxonomie génétique ou phylogénique

Les critères sont recherchés :

1. La taille du génome
2. La composition des bases d'ADN sous la forme de pourcentage de G+C (GC%)
3. Le taux d'hybridation ADN/ADN
4. La séquence de l'ADN qui code pour l'ARN ribosomal 16 S

3.2.1. La taille du génome

Selon les espèces voir les genres la taille du génome est variable. Les bactéries paratrophes (parasite, intracellulaire obligatoire) le génome est très réduit.



Tiré de : <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/chroms-genes-prots/genomes.html>

3.2.2 Composition en base d'ADN (Coefficient de Chargaff)

Du nom de la personne qui a remarqué (dans les années 1940) que :

Quelque soit l'espèce d'origine, l'ADN contient toujours autant de purine que de pyrimidine soit :

$$(A + G) = (C + T) \text{ ou } (A+G) / (C+T) = 1$$

De plus, il y a autant de thymine que d'adénine $A/T = 1$, autant de guanine que de cytosine $G/C = 1$

Par contre, le rapport $(A+T)/(C+G)$ varie beaucoup : **il est caractéristique de l'espèce.**

Ce coefficient est appelé coefficient de Chargaff. Il peut être calculer suite à un séquençage par la formule suivante $((G+C)/(A+T+G+C)) \times 100$

Ou bien par une méthode de spectrométrie ultra-violet.

Les deux brins d'ADN peuvent se séparer par rupture des liaisons hydrogènes qui lient les bases.

On peut observer ce phénomène en chauffant la solution (ou milieu acide ou basique qui ionise les bases). Ce phénomène est appelé **fusion**. La température de fusion (**T_m**), est la température ou 50% de l'ADN est déroulé. On la mesure par spectrophotométrie à 260 nm. Lors de la fusion la DO₂₆₀ augmente c'est l'effet hyperchrome.

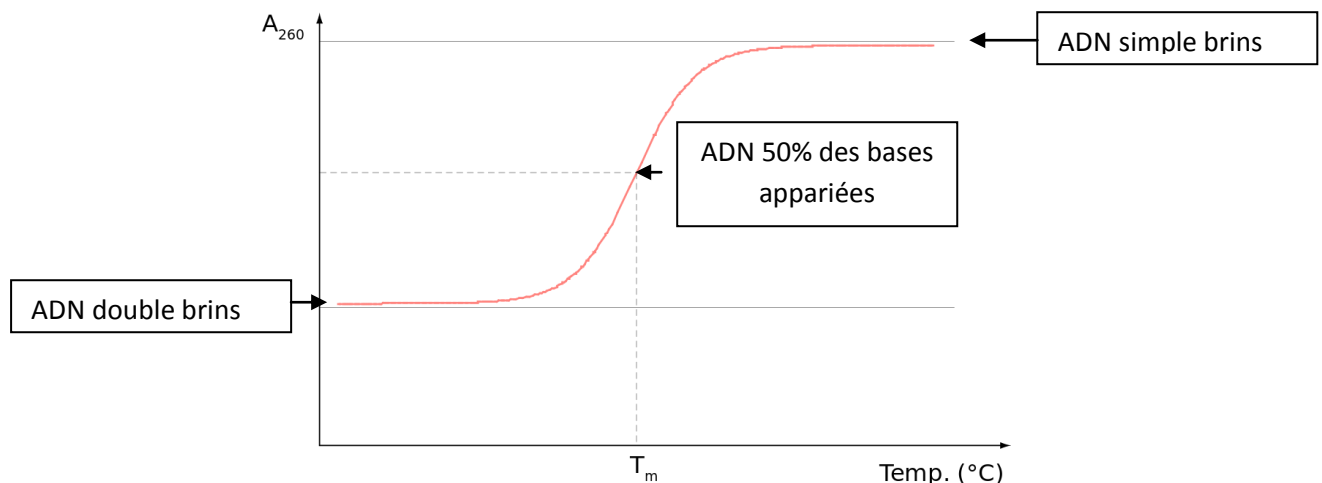
La température de fusion T_m varie avec la teneur en GC% de l'ADN.

Exemple: *E. coli* T_m = 72°C (GC% = 50) • *P. aeruginosa* T_m = 79°C (GTC% = 66). La valeur du T_m est variable, il dépend de la composition en bases de l'ADN. Plus la teneur en (G+C) d'un ADN est importante, plus la valeur du T_m est grande car les 2 brins sont d'autant plus difficiles à séparer car maintenues par plus de liaisons H. (3 liaisons pour GC contre seulement 2 pur AT)

Détermination du point de fusion T_m

On définit le point de fusion noté T_m = température pour laquelle l'absorbance à augmenter de moitié, l'ADN est donc demi dénaturé.

T_m = t (°C) pour $\Delta A/2$.



Règles d'interprétations du GC% :

- 2 espèces microbiennes ayant des GC% différents n'ont aucune communauté génétique.
- 2 espèces microbiennes ayant les mêmes séquences nucléotidiques ont nécessairement le même GC%.
- 2 espèces microbiennes ayant le même GC% peuvent être génétiquement éloignées.
- Les bactéries appartenant à la même espèce ont le même GC%.

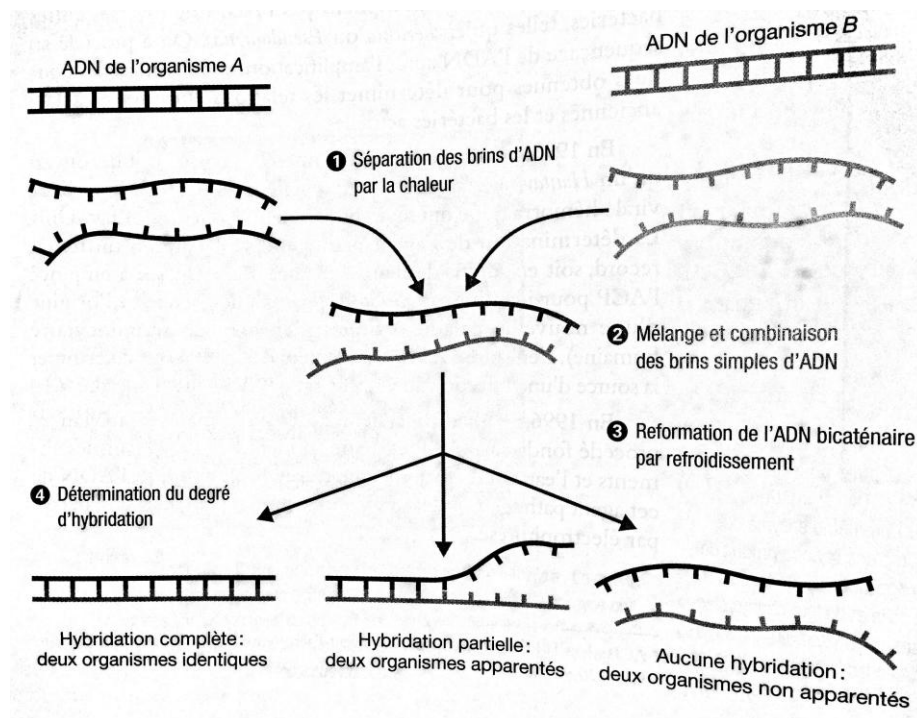
3.2.3 Hybridation ADN/ADN

Les températures clés et leurs définitions

T_m : Point de fusion (Thermal elution midpoint) : Température de dénaturation de 50% de l'hybride

T_{or} : Température optimale de renaturation : 25° à 30°C < Température de dénaturation

T_{rr} : Température restrictive de renaturation: 10 à 15 °C < Température de dénaturation



Grace à cela on a démontré qu'en réalité que *Shigella* et *Escherichia* forment génétiquement la même espèce, ainsi que *Salmonella* et *Arizona*.

A. Homologie ADN/ADN à T_{or}

La renaturation ou hybridation, est maximum à T_{or}.

T_{or} = 60°C pour les Entérobactéries.

L'homologie, c'est-à-dire le % de base appariées / aux bases totales est de 70 à 100 % pour des mêmes espèces.

Elle est de 0 à 60 % pour des espèces différentes.

B. Stabilité thermique des hybrides

On utilise le T_m .

Après l'obtention des hybrides à T_0 (Température optimale de renaturation), On augmente la température doucement au dessus de T_0 pour avoir que 50% de dénaturation de l'hybride.

On compare les hybridations homologues et hétérologues en parallèle ($A \times A$ et $A \times B$). La différence de stabilité thermique ΔT_m est proportionnelle au % de bases non appariées.

1 à 1,6 °C de ΔT_m = 1% de bases non appariées.

Mêmes espèces : ΔT_m entre 1 et 5°C (5% de base non appariées).

Espèces différentes : ΔT_m entre 7 et 20° C.

C. Homologie ADN/ADN à T_{rr}

Cette approche est très utile pour des souches présentant des Homologie ADN/ADN à T_0 , égalent à 60 -70%. Cette température est défavorable à la renaturation, elle ouvre les ADN hybrides mal ou peu appariés. A T_{rr} les même espèces ont des homologies de 55 à 100%. Les espèces différentes 0 à 50 % d'homologie.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour l'analyse par hybridation ADN/ADN.

Hybridation sur filtre de nitrocellulose (utilisation de radioactivité)

Technique de l'hydroxyapatite (utilisation de radioactivité)

Technique de l'endonucléases (utilisation de radioactivité)

Technique optique (pas de radioactivité)

5-3 Le séquençage des ARN ribosomaux (ARNr)

Selon **Woese**, les ARNr sont les meilleurs chronomètres moléculaires par :

- **La constance de leur fonction**
- **Leur répartition dans tous les organismes**
- **Leur grande taille**

On peut les séquencer directement et rapidement.

On distingue:

- **ARNr 23S 2900 nucleotides (grand ARNr)**
- **ARNr 16S 1540 nucleotides (petit ARNr)**
- **ARN r 5S 120 nucleotides (très petit ARNr)**

On peut purifier l'ADN génomique (le chromosome bactérien) et utiliser l'ACP (l'amplification en chaîne par polymérase) ou PCR en anglais. C'est une technique qui permet de multiplier l'ADN codant pour l'ARN 16S

pour l'analyser par électrophorèse et le séquencer base par base. A partir d'une copie on peut obtenir 01 million de copies.

Plus de 97,5 % d'homologie, même genre. Pour l'espèce possibilité faire des hybridations ADN/ADN.

Entre 90 et 97,5%: espèces différentes, a priori même genre, à conforter par chimiotaxonomie.

Moins de 90%: a priori genres différents

Grâce aux statistiques et à l'informatique on peut construire des arbres phylogénétiques.

Famille	Genre	Espèce	Sous-espèce	Souche
Séquençage génomique				
Séquençage de l'ARNr 16S				
GC Mol%				
Hybridation ADN-ADN				
Typage de séquence multilocus				
Profilage des protéines totales				
Prise d'empreinte génomique				

La résolution taxinomique des différentes techniques moléculaires

De nombreux taxinomistes pensent que seule une combinaison des données génotypiques et phénotypiques peut permettre d'établir une phylogénie. **C'est l'approche polyphasique.**

Les taxinomistes utilisent un maximum de caractères écologiques, morphologiques, métaboliques comme des propriétés moléculaires, afin d'obtenir les résultats les plus fiables et les plus réalistes.

3.3 La Classification selon le manuel de Bergey

Ce qu'il faut savoir c'est qu'il n'existe pas une classification officielle des bactéries, mais on se réfère à la classification du manuel de Bergey. Cette classification est la plus acceptée par tous les microbiologistes.

Dans ces premières éditions, en 1936, elle se basait sur l'étude :

De leur morphologie microscopique (bactérie de type coque, bacille, vibron ; isolés, par deux, en chaînettes...).

De leur morphologie macroscopique (taille, forme, couleur... des colonies sur milieux de culture gélosés)

De leur mobilité (mobilité ou immobilité à une température donnée)

De la présence de spores (à l'état frais ou après coloration)

Du résultat de la coloration de Gram (coloration de Gram positive ou négative)

De la température de croissance (4° C, 20° C, 30° C, 37° C...), du type respiratoire (aérobie, anaérobie strict, aéro-anaérobie facultatif, microaérophile..), des besoins nutritionnels (nécessité de substances particulière pour le développement), de la capacité à utiliser certaines sources de carbone ou d'azote (on parlera de biotypes ou biovars).

A cette période, les procaryotes étaient répartis en 4 divisions reconnues sur la base de l'existence ou non de la paroi. : **Les Gracilicutes, les Firmicutes, les Tenericutes, les Mondosicutes.**

I-Gracilicutes *Gracilis cutis* : peau fine. (Eubactéries Gram -)

Anoxyphotobacteriae (photosynthèse sans production d'oxygène)

Photobacteriae (cyanobactéries)

Scotobacteriae (pas de photosynthèse)

II-Firmicutes *Firmus cutis* : peau dure. (Eubactéries Gram +)

Firmibacteriae (% G+C faible)

Thallobacteriae (%G+C fort, ramifiées)

III-Tenericutes *Tener cutis* : peau tendre. (Eubactéries sans paroi, gram -)

Mollicutes

IV-Mendosicutes *mendosus cutis* : peau défectueuse

Archaeobacteriae (archéobactérie gram + / -).

Dans l'édition récente, moderne avec l'utilisation de la classification polyphasique :

Les procaryotes sont divisés en **deux domaines Eubacteria et Archaeobacteria** qui comprennent **34 phylums** . 30 pour **Eubacteria** et 5 pour **Archaeobacteria**.

Domaines	2	<i>Archaea</i>	<i>Eubacteria</i>
Phylums	34	5	29
Classes	57	9	48
Sous-Classes	6	0	6
Ordres	119	15	104
Sous-ordres	20	0	20
Familles	292	26	266
Genres	2100 environ	108	2000 environ
Espèces	7300 environ	250 environ	7000 environ
Sous-espèces	450 environ	0	450 environ

Divisons des procaryotes

Pour une classification complète que l'étudiant aura le plaisir d'étudier en L3 Microbiologie (Taxinomie bactérienne), je conseille le lien suivant :

http://garciajeanlouis9051.perso.neuf.fr/ca_euryarchaeota.html.

Tous les phylums sont décrits en détails.

Domaine Archaea	Domaine Eubacteria (I-XIII)	Domaine Eubacteria (XIV-XXII)	Domaine Eubacteria (XXIII-XXX)
AI. Crenarchaeota	BI. Aquificae	BXIV. Firmicutes	BXXIII. Fusobacteria
AII. Euryarchaeota	BII. Thermotogae	CI. Clostridia	BXXIV. Verrucomicrobia
AIII. Korarchaeota	BIII. Thermodesulfobacteria	CII. Negativicutes	BXXV. Gemmatimonadetes
AIV. Nanoarchaeota	BIV. Deinococcus-Thermus	CIII. Bacilli	BXXVI. Lentisphaerae
AV. Thaumarchaeota	BV. Chrysiogenetes	CIV. Thermolithobacteria	BXXVII. Dictyoglomi
	BVI. Chloroflexi	CV. Erysipelotrichi	BXXVIII. Caldiseica
	BVII. Thermomicrobia	BXV. Tenericutes	BXXIX. Elusimicrobia
	BVIII. Nitrospirae	BXVI. Actinobacteria	BXXX. Armatimonadetes
	BIX. Deferribacteres	SCI. Acidimicrobiae	
	BX. Synergistetes	SCII. Rubrobacteridae	
	BXI. Cyanobacteria	SCIII. Coriobacteridae	
	BXII. Chlorobi	SCIV. Actinobacteridae	
	BXIII. Proteobacteria	SCV. Nitriliruptoridae	
	CI. Alpha-Proteobacteria	BXVII. Planctomycetes	
	CII. Beta-Proteobacteria	BXVIII. Chlamydiae	
	CIII. Gamma-Proteobacteria	BXIX. Spirochaetes	
	CIV. Delta-Proteobacteria	BXX. Fibrobacteres	
	CV. Epsilon-Proteobacteria	BXXI. Acidobacteria	
	CVI. Zeta-Proteobacteria	BXXII. Bacteroidetes	
		CI. Bacteroidetes	
		CII. Flavobacteria	
		CIII. Sphingobacteriia	
		CIV. Cytophagia	

Les 35 phylums des procaryotes et quelques classes (C) et sous classes (SC).

Chapitre 4 : Nutrition bactérienne

Introduction

Une bactérie peut avoir un métabolisme intense qui se traduit par une augmentation de la taille, mais, surtout du nombre des cellules. Cet état est dit **végétatif**. Dans certaines conditions, la bactérie ralentit son métabolisme et ne se divise plus. C'est l'état **de repos**. Dans les deux états, la bactérie a des besoins nutritifs (pour se diviser ou juste se maintenir en vie). Selon la nature de ces besoins, on définit des bactéries **prototrophes** et des bactéries **auxotrophes**.

Les bactéries prototrophes ont des besoins élémentaires (**Eau-source d'énergie-source de carbone et d'azote – macro et micronutriments**). Les bactéries auxotrophes nécessitent en plus des besoins élémentaires, **des facteurs de croissances**. Les **facteurs environnementaux** sont également très importants pour la croissance, le pH, la température, la pression osmotique, la présence ou non d'oxygène.

4.1 Besoins élémentaires

4.1.1 L'eau

L'eau représente 70% du poids cellulaire total chez *Escherichia coli*. Elle solubilise les nutriments, elle joue un rôle important dans leur transport et ceci dans les deux sens. C'est le solvant de la vie, où se déroulent toutes les réactions métaboliques (catabolisme plus anabolisme).

Un paramètre appelé « **activity of water** », **aw**, ou **activité de l'eau**) quantifie la disponibilité de l'eau libre, non associée aux nutriments. Elle varie de 0 à 1.

Certains germes ne se développent que pour une valeur de l'Aw supérieure à 0,97. A l'opposé, les bactéries halophiles qui nécessitent la présence de sel (NaCl, 1 à 15%) l'aw est de l'ordre de 0.75.

Les endospores peuvent survivre dans un environnement dépourvu d'eau libre. Le degré d'humidité des aliments a une influence sur leur conservation et leur séchage. C'est un procédé de conservation basé en partie sur la diminution de l'aw.

Activité de l'eau	Produits	Exemples d'organismes ^a
1,000	Eau pure	<i>Caulobacter</i> , <i>Spirillum</i>
0,995	Sang humain	<i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i>
0,980	Eau de mer	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>
0,950	Pain	La plupart des bacilles Gram positif
0,900	Sirop d'érable, jambon	Coques Gram positif tels que <i>Staphylococcus</i>
0,850	Salami	<i>Saccharomyces rouxii</i> (levure)
0,800	Gâteau aux fruits, confiture	<i>Saccharomyces bailii</i> , <i>Penicillium</i> (champignon)
0,750	Lacs salés, poisson salé	<i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i>
0,700	Céréales, sucre, fruits secs	<i>Xeromyces bisporus</i> et autres champignons xérophiles

^a Exemples d'organismes procaryotes ou de champignons capables de croissance dans un milieu de culture dont l'activité de l'eau est ajustée à la valeur indiquée.

4.1.2 Source d'énergie

Sur la base de la source d'énergie, on distingue **les bactéries chimiotrophes et les bactéries phototrophes**.

Les bactéries chimiotrophes puisent leurs énergies des réactions chimiques d'oxydoréduction. Si les composés (donneurs d'électrons) sont inorganiques comme H₂S, H₂, Fe²⁺ ou NH₃ ..., les bactéries sont dites **chimolithotrophes**. Si le donneur d'électron est organique, elles sont dites **chimioorganotrophes**. La réaction type peut se résumer comme suit : D = donneur électrons ; A= accepteur d'électron



Les bactéries phototrophes puisent leur énergie de la lumière. Si la source d'électrons est minérale, les bactéries sont dites **photolithotrophes**, si la source d'électrons est organique, les bactéries sont dites **photoorganotrophes**.

4.1.3 Source de carbone

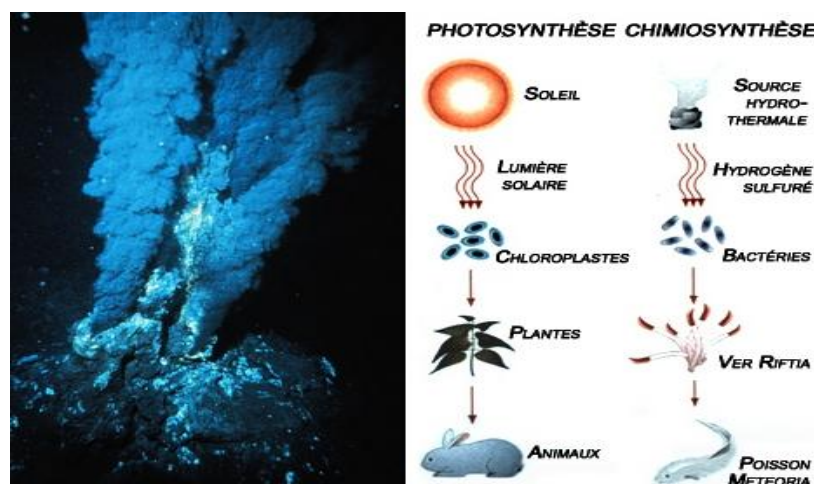
Le carbone est l'élément constitutif le plus abondant chez les bactéries. Si la source est le dioxyde de carbone (CO₂) les bactéries sont dites **autotrophes**, c'est le cas des bactéries **phototrophes** et la plupart des bactéries **chimolithotrophes**. Si la source de carbone assimilable est un substrat organique, ces bactéries sont qualifiées **d'hétérotrophes**. Les bactéries **hétérotrophes** peuvent dégrader de nombreuses substances hydrocarbonées : alcools, acides organiques, sucres ou polyholosides. La liste des substrats carbonés utilisables par une souche bactérienne comme unique source de carbone et d'énergie constitue **l'auxanogramme de la souche**.

Les **photoautotrophes** sont photosynthétiques. On peut citer les cyanobactéries, les bactéries vertes, les bactéries pourpres non sulfureuses.

La **photosynthèse bactérienne** est différente de celle des végétaux supérieurs. Elle ne conduit jamais à la libération d'oxygène libre. Les pigments et les donneurs d'électrons sont également différents (hydrogène, soufre, jamais l'eau comme chez les plantes).

Les **photohétérotrophes** sont photosynthétiques et puisent le carbone de composés organiques.

Les **chimioautotrophes**, n'ont besoin ni de matière organique, ni de lumière du soleil. Ils puisent leur énergie de substance inorganique et transforment le CO₂ en matière organique. Comme exemples, les bactéries des sources chaudes hydrothermales profondes (fumeurs noirs). Elles nourrissent tout un écosystème.



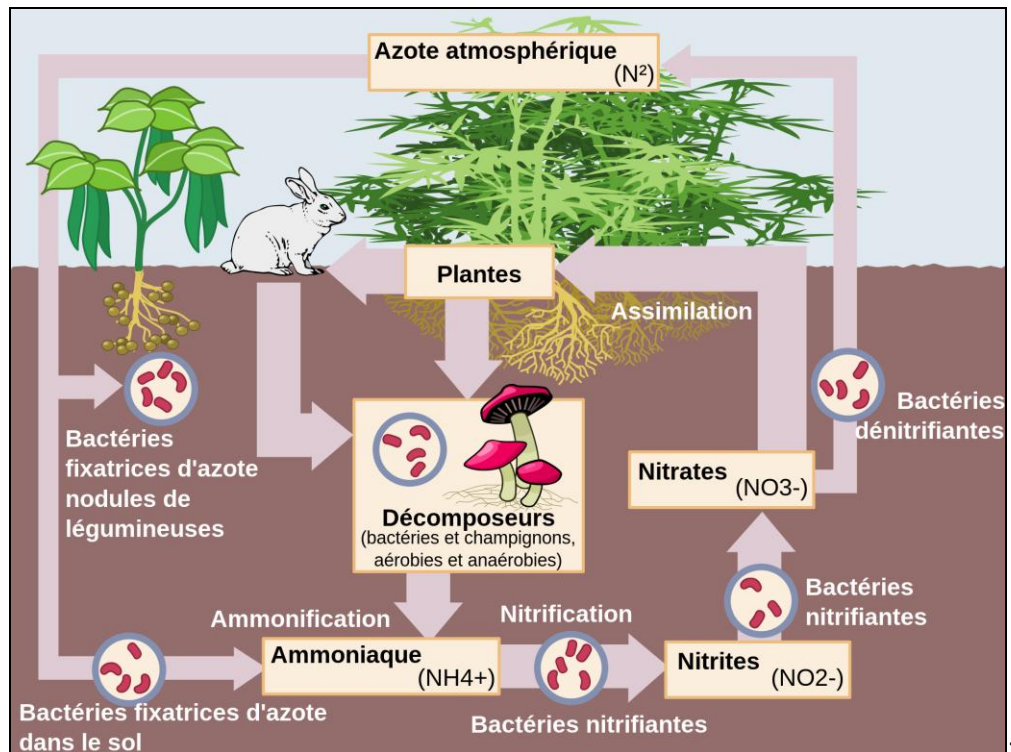
Fumeurs noirs au fond des océans

Comme deuxième exemple, on peut citer **les bactéries méthanogènes** (Archaeae) qui synthétisent le méthane (CH_4) à partir de CO_2 .

Les chimiohétérotrophes puisent leur énergie et leur carbone des substances organiques. C'est le cas de la plus part des bactéries d'intérêt médical (pathogènes).

4.1.4 Source d'azote

La synthèse des protéines et des acides nucléiques nécessite des substances azotées. L'azote représente 12% du poids sec des bactéries et 80% de l'air qu'on respire. **Le cycle biogéochimique simplifié de l'azote:**



L'azote moléculaire (N_2) est fixé par quelques bactéries vivant en symbiose avec des légumineuses (bactéries fixatrices d'azote) ou des champignons ou par des bactéries jouant un rôle dans la fertilisation des sols.

Pour la majorité des bactéries la source d'azote est constituée par d'autres composés inorganiques (ammoniac, nitrites, nitrates) ou par des sources organiques (groupements amines des composés organiques).

4.1.5 Macronutriments

Les bactéries ont besoin de **phosphore, de soufre, de magnésium, de calcium et de sodium**.

Le phosphore est important dans la synthèse des acides nucléiques et phospholipides des membranes plasmiques et externes. Sans oublier l'ATP (énergie).

Il est apporté sous forme de phosphate organique et inorganique

Le soufre est retrouvé au niveau de deux acides aminés qui jouent un rôle dans les ponts disulfure (**la méthionine et la cystéine**). Il intervient dans les structures complexes des protéines. Il est également utilisé dans la synthèse des vitamines. (Biotine, coenzyme A). Le soufre cellulaire est d'origine inorganique (sulfate SO_4^- , soufre métallique FeS , CuS , ZnS).

Le potassium joue un rôle comme cofacteur enzymatique, **le magnésium** aussi, qui, en plus a une fonction de stabilisateur de structures cellulaires.

Le calcium joue un rôle important dans la résistance à la chaleur des endospores (chez *Bacillus*, *Clostridium*). Il stabilise également la paroi des bactéries.

Le sodium est important pour la croissance des bactéries **halophiles** (du grec *halos*, sel et *philein*, aimer).

Enfin **le Fer**, qui intervient dans la chaîne respiratoire (bactéries aérobies), élément des cytochromes au niveau de la membrane plasmique. Les bactéries possèdent **des sidérophores** qui capturent **le fer** insoluble et le transportent à l'intérieur des cellules bactériennes.

4.1.6 Les oligoéléments

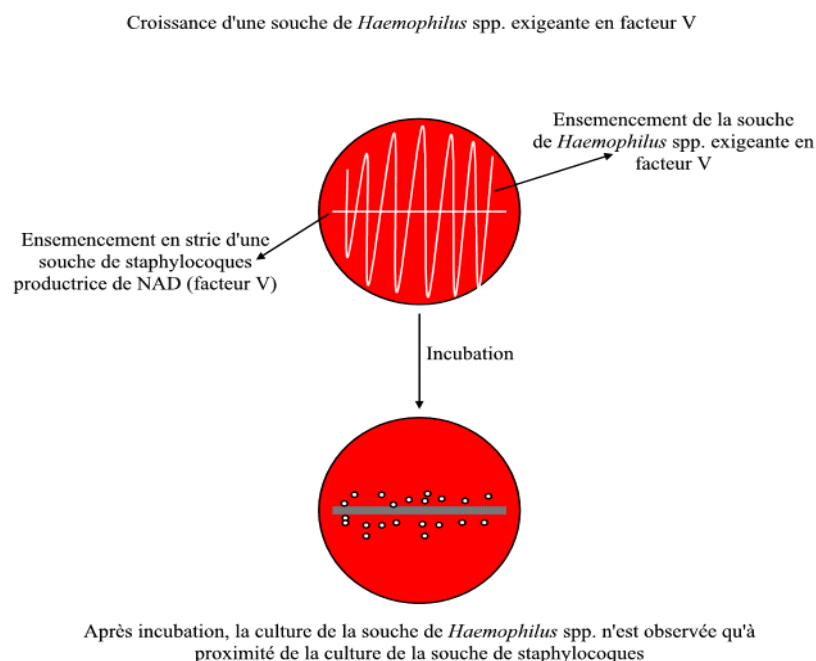
Ils sont indispensables à la cellule en très faibles quantités. On peut citer le cobalt, le zinc, le bore, le cuivre, le manganèse, le sélénium.... Très importants pour le fonctionnement des enzymes. Ils ne sont pas tous requis par une même espèce.

4.2 Facteurs de croissance

Selon les besoins nutritionnels nécessaires à la croissance des bactéries, on a défini les bactéries **prototrophes** et les bactéries **auxotrophes**. Les prototrophes ont des besoins élémentaires, alors que les auxotrophes nécessitent en plus, un ou plusieurs **facteurs de croissance** qu'elles sont **incapables de synthétiser**. Soit ils sont fournis par l'environnement ou rajoutés dans le milieu de culture.

A ne pas confondre avec un **métabolite essentiel** est un composé organique indispensable à la croissance des bactéries mais, qu'elles sont capables de synthétiser.

Les facteurs de croissance sont **des vitamines B1, B6, B12, acide folique, des précurseurs de coenzymes (de NAD, de coenzyme A, de FMN, de FAD)**. La **syntrophie** est un phénomène d'interaction métabolique, qui se traduit sur un milieu solide par la présence de colonies satellites d'une bactérie auxotrophe autour de celles d'une bactérie prototrophe productrice du facteur de croissance.



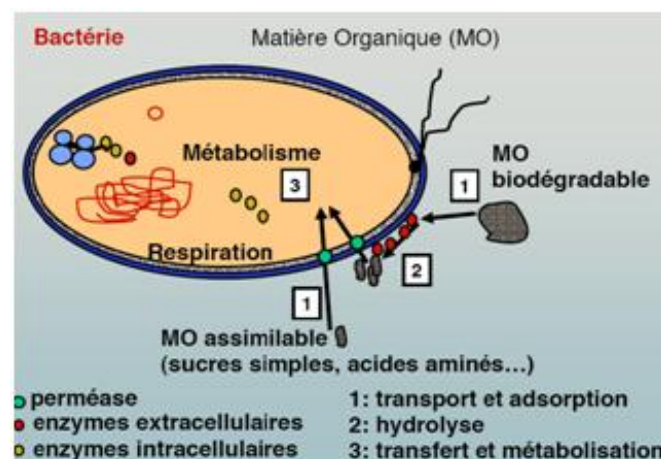
4.3 Résumé des différents types trophiques (nutritionnels)

Type du besoin	Nature du besoin	Type trophique
Source d'énergie	Rayonnement lumineux	Phototrophe
	Oxydation de composés organiques ou inorganiques	Chimiotrophe
Donneur d'électrons	Minéral	Lithotrophe
	Organique	Organotrophe
Source de carbone	Composé minéral	Autotrophe
	Composé organique	Hétérotrophe
Facteurs de croissance	Aucun besoin	Prototrophe
	Nécessaires	Auxotrophe

Les bactéries intracellulaires obligatoires, comme les *Chlamydiae*, tirent leur énergie de la cellule qu'elles parasitent et elles sont qualifiées de **paratrophes**.

4.4 Particularités du métabolisme bactérien

Les cellules bactériennes sont trop petites pour stocker toutes les enzymes nécessaires à leur métabolisme. Elles les synthétisent au fur et à mesure de leurs besoins et selon la nature des substrats. Les enzymes sont généralement inductibles par la présence du substrat. De plus, les grosses molécules (2) ne peuvent pas traverser la paroi et la membrane plasmique.



Les bactéries sécrètent des exoenzymes pour les dégrader en petites molécules transportables par des perméases (1). Une partie du catabolisme est effectuée à l'extérieur de la cellule.

4.5 Les facteurs environnementaux, physico-chimiques

Les facteurs environnementaux, comme **la température, le pH, la salinité, l'osmolarité et l'oxygène** influencent et contrôlent la croissance bactérienne. Chaque bactérie possède des valeurs optimales pour chaque facteur et par conséquent, selon les valeurs optimales, on définit différentes catégories de bactéries.

4.5.1 Température

Les psychrotrophes : Peuvent se cultiver à **0°C**. Température optimale de multiplication entre **20 à 25 °C**.

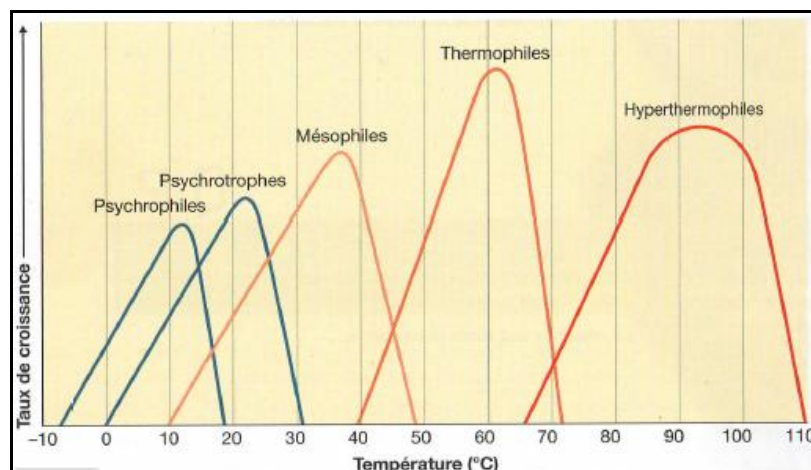
Les bactéries psychrophiles : Température maximale 20°C. Température optimale de croissance inférieure à 15 °C.

Les cryophiles : peuvent se développer à des températures négatives. Elles sont souvent isolées des matières fécales d'animaux polaires. Température optimale de croissance (- 5 °C).

Les mésophiles : croissance entre **25 et 40 °C**. Optimum à **37°C**. la majorité des bactéries pathogènes.

Les thermophiles : température optimale entre **50 et 60 °C**.

Les hyperthermophiles ont une température optimale de croissance entre **70 °C et 110°C**.



Taux de croissance en fonction de la température

4.5.2 pH

La majorité des bactéries se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (**6,5 à 7,5**), mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH. On distingue :

Les acidophiles préfèrent un pH acide. C'est le cas des lactobacilles dont le pH optimal est de **6**. *Thermoplasma acidophilum* a un pH optimal entre **0,8 et 3**.

Les **alcalophiles** préfèrent des pH alcalins. Ainsi, le pH optimal est de **9** pour la multiplication de *Vibrio cholerae*. *Alkaliphilus transvaalensis* est capable de croître à un pH de **12,5**. En culture, le métabolisme bactérien engendre des acides qui inhiberaient la multiplication bactérienne. Pour éviter cela, on rajoute des solutions tampons qui maintiennent un pH optimal.

4.5.3 Pression

Les bactéries **barophiles** (du grec *baros*, poids, pesanteur), ont une La croissance optimale dans une atmosphère dont la pression est supérieure à la pression atmosphérique. Ce sont les bactéries des eaux profondes des mers et des océans.

4.5.4 Pression osmotique

Les bactéries sont peu sensibles aux variations de pression osmotique car elles sont **protégées par leur paroi**. A l'inverse des Mycoplasmes.

Selon leur sensibilité à la pression osmotique, on distingue trois catégories de bactéries.
Les bactéries non-halophiles : NaCl est inférieure à 0,2 M.

Les espèces halophiles : NaCl supérieure à 0,2 M pour les moins halophiles (*Cobetia marina*) à 5,2 M pour les plus halophiles *Halobacterium salinarum*.

Les espèces halotolérantes comme les *Staphylococcus*, les *Listeria* ou les *Lactobacillus*. Ils tolèrent 7.5 à 15% de NaCl. Les anciens conservent les aliments en rajoutant du sel ou du sucre ce qui entraîne une augmentation de la pression osmotique. La croissance des bactéries est limitée.

Les bactéries **osmophiles** se multiplient en présence de grandes concentrations de sucre.

4.5.5 Besoins gazeux

L'oxygène est en réalité un gaz très toxiques s'il n'est pas neutraliser par les cellules qui en ont besoin. Lors de la respiration aérobie, il est neutralisé en se combinant à l'hydrogène pour former une molécule d'eau. C'est le cas des **aérobies stricts**. Ils utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons et neutralisent les différentes formes toxiques (radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyl ...) par différentes enzymes (**catalase, oxydase, superoxyde dismutase**)

	a) Aérobies stricts	b) Anaérobies facultatifs	c) Anaérobies stricts	d) Anaérobies aérotolestants	e) Microaérophiles
Effet de l'oxygène sur la croissance	Croissance aérobie seulement; la présence de molécules d'O ₂ est essentielle.	Croissance aérobie ou anaérobie; croissance optimale en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance anaérobie seulement; arrêt de la croissance en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance anaérobie seulement; toutefois, la croissance se poursuit en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance aérobie seulement; les molécules d'O ₂ sont essentielles en faible concentration.
Croissance bactérienne dans un tube contenant un milieu de culture solide					
Explication du modèle de croissance	La croissance a lieu seulement là où une forte concentration de molécules d'O ₂ a diffusé dans le milieu.	La croissance est optimale là où la concentration de molécules d'O ₂ est la plus élevée, mais elle a lieu partout dans le tube.	La croissance a lieu seulement là où il n'y a pas de molécules d'O ₂ .	La croissance est uniforme partout dans le tube; la molécule d'O ₂ n'a aucun effet.	La croissance a lieu seulement là où une faible quantité de molécules d'O ₂ a diffusé dans le milieu.
Explication des effets de l'oxygène	La présence d'enzymes (catalase et superoxyde dismutase SOD) permet la neutralisation des formes toxiques de la molécule d'O ₂ , qui peut alors être utilisée.	La présence d'enzymes (catalase et SOD) permet la neutralisation des formes toxiques de la molécule d'O ₂ , qui peut alors être utilisée.	Il n'y a pas d'enzyme permettant la neutralisation des formes toxiques de la molécule d'O ₂ ; la molécule d'O ₂ n'est pas tolérée.	La présence d'une enzyme, la SOD, permet la neutralisation partielle des formes toxiques de la molécule d'O ₂ ; la molécule d'O ₂ est tolérée.	Des quantités létales de formes toxiques de la molécule d'O ₂ sont produites en présence d'O ₂ atmosphérique.

Comportement des bactéries vis-à-vis de l'oxygène et types respiratoire

Les anaérobies facultatifs peuvent croître en absence ou en présence d'oxygène. Mais leur croissance est maximale en présence de ce dernier (Production d'ATP élevée). En absence d'oxygène, elle utilise la fermentation ou la respiration anaérobie pour produire de l'énergie. C'est le cas **d'*E. coli***.

Les anaérobies stricts n'ont aucune enzyme capable de neutraliser les formes toxiques de l'oxygène. Leur croissance doit se faire dans une atmosphère dépourvue d'oxygène. C'est le cas de ***Clostridium***.

Les anaérobies aérotolérants n'utilisent pas l'oxygène pour leur croissance mais ce gaz n'a aucun effet sur elles. C'est le cas des **Lactobacilles**.

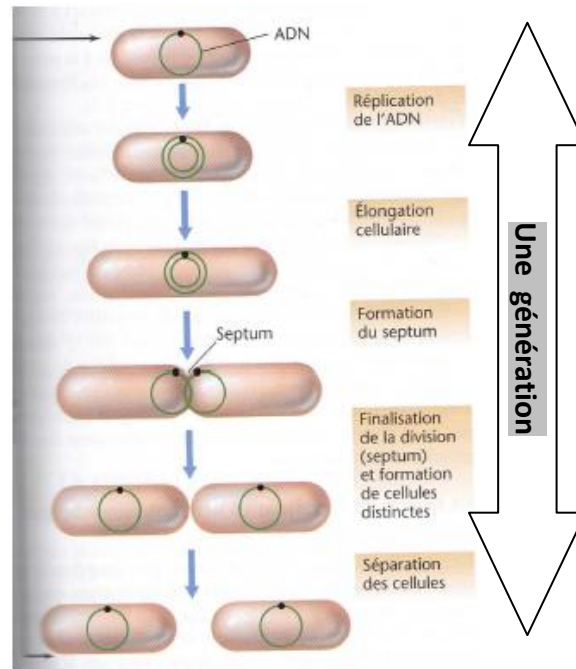
Les microaérophiles qui ont besoin d'oxygène, mais à une proportion inférieure à celle de l'air.

Enfin, les **capnophiles** qui exigent la présence de concentration très élevées de CO₂ (10 à 30 fois supérieures à celle de l'air). Ces bactéries poussent à l'intérieur des hôtes (humain ou animaux). C'est le cas de ***Helicobacter pylori* ; *Neisseria gonorrhea***.

Chapitre 5 : Croissance bactérienne

Introduction

La croissance bactérienne se traduit par **une augmentation du nombre de bactéries**. On observe également un allongement de la taille et une augmentation du volume, plus visibles chez les formes en bâtonnets. Ces dimensions, lorsqu'elles sont atteintes, déclenchent la division cellulaire par **scissiparité**. Une bactérie donne deux cellules filles.



La division par scissiparité

D'autres mécanismes de division existent chez des bactéries particulières, comme **le bourgeonnement** (observé chez les cyanobactéries) et **la fragmentation** (chez les bactéries filamenteuses).

Le point de division est appelé **septum** qui va former la cloison qui séparera les deux cellules filles. Chaque cellule recevra une copie du chromosome et la moitié des composants cellulaires.

Chez *Escherichia coli*, des protéines appelées **Fts (filaments sensibles à la chaleur)**, ressemblant aux microtubules des cellules animales, jouent un rôle important dans cette division en formant un anneau **FtsZ** transversal ou vont se concentrer toutes les enzymes nécessaires à la division, synthèse du septum, de la paroi des cellules filles...



Anneau FtsZ d'*E. coli* en division, visualisé par immunofluorescence.

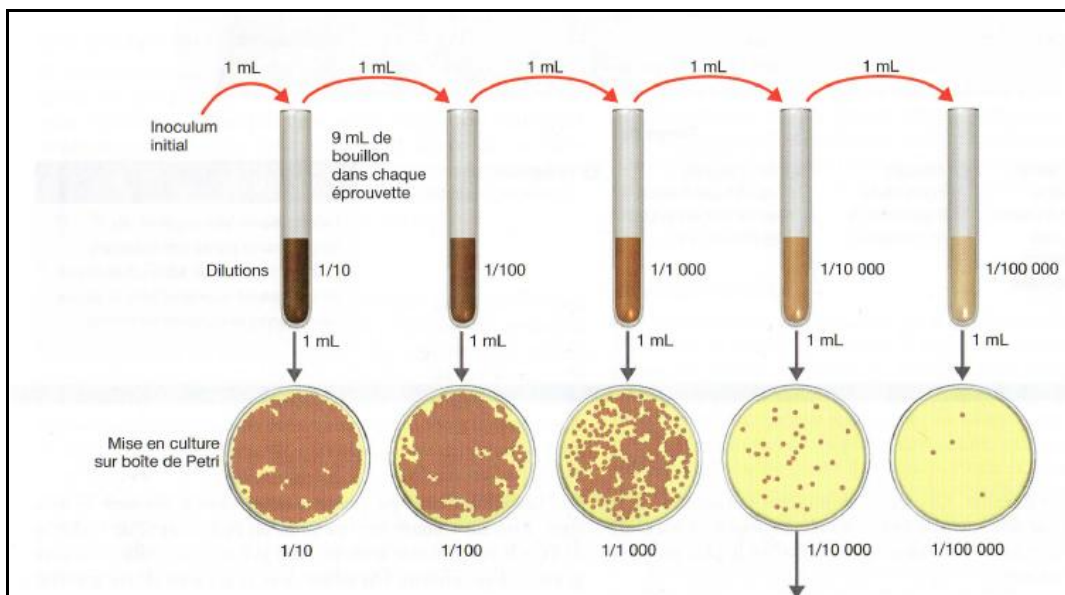
5.1 Mesure de la croissance

Plusieurs techniques sont utilisées pour analyser, suivre et mesurer la croissance. Chacune a des avantages et des inconvénients. On distingue les méthodes directes et les méthodes indirectes. Certaines distinguent les cellules vivantes des cellules mortes et d'autres, en sont incapables.

5.1.1 Mesures directes : Dénombrement des bactéries après culture

Le résultat est exprimé en nombre **de bactéries par ml**. On peut partir de 1 ml de lait, de jus ou quelques mg de viandes broyées, dans 9 ml d'eau stérile (**première dilution 1/10**).

On procède ensuite à une dilution en série de **1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000**. Ensuite, 1 ml de chaque dilution est étalé soit **en profondeur** soit **en surface** en utilisant des milieux solides sur boîte de Petri.



On prend en considération les boîtes de 30 à 300 colonies.

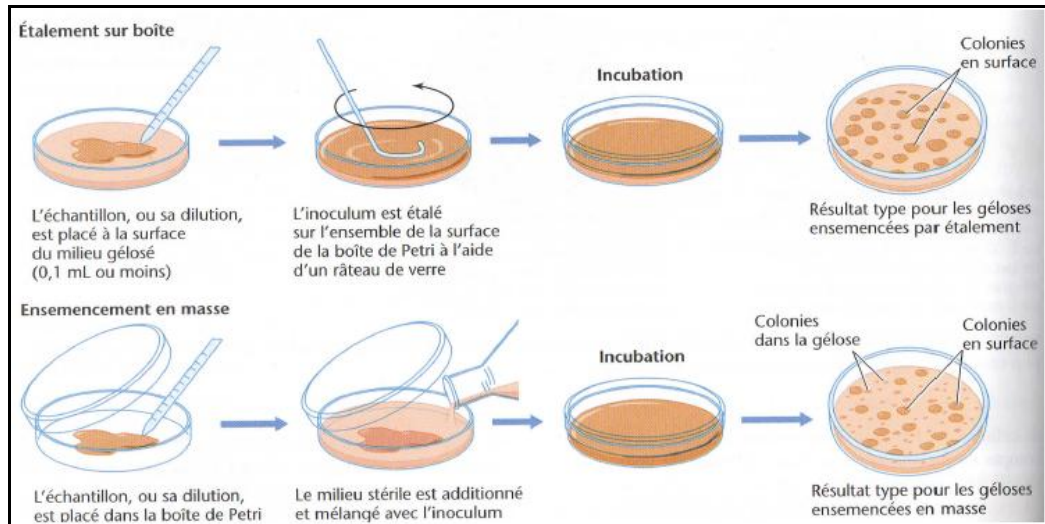
Le nombre de bactérie.

Le calcul se fait comme suit : (**dilution 1/10000, 125 colonies obtenues**) : $125 \times 10000 = 1,25$ million bactérie par ml.

On suppose dans ce cas que chaque colonie est issue d'une bactérie, mais **en réalité c'est faux**. On parle d'unités formant colonies (**UFC**). Chaque colonie provient de plusieurs bactéries en chainettes ou en amas.

L'ensemencement par étalement présente l'inconvénient que l'échantillon peut **ne pas être absorbé dans sa totalité**.

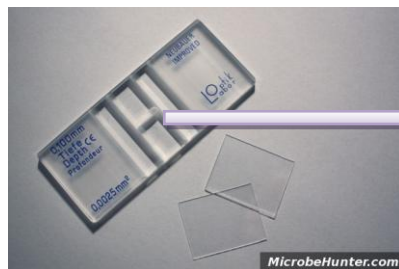
L'ensemencement **en profondeur** ou en masse exige que les bactéries puissent supporter la température de la gélose liquide en surfusion (50°C). L'échantillon est mélangé avec la gélose et les colonies vont pousser en profondeur et en surface.



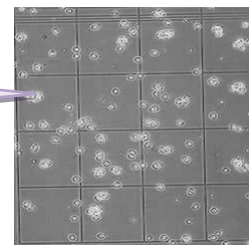
Dénombrement des bactéries viables

5.1.2 Mesure directe du nombre de cellules

A partir d'un volume connu d'une suspension bactérienne on peut faire une numération totale des cellules au microscope. On utilise une lame spéciale appelée **chambre de comptage de Petroff-Hausser**.



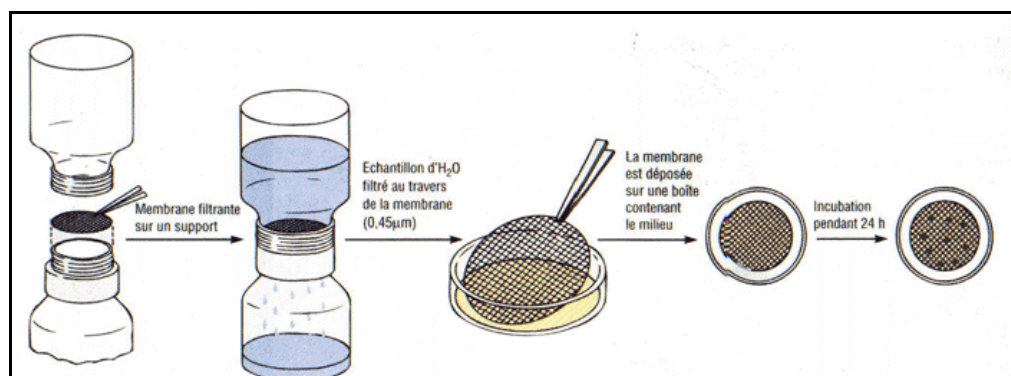
Chambre de comptage de Petroff-Hausser



Comptage au microscope

5.1.3 Mesure par filtration sur membrane

Très utiles lorsque le nombre des bactéries est très bas. Utilisée pour la recherche des coliformes dans l'eau, comme preuve de contamination fécale. On procède par filtration sur membrane de 100 ml d'eau puis la membrane est mise en culture sur boîte de Petri (Gélose).



Filtration d'eau sur membrane et dénombrement

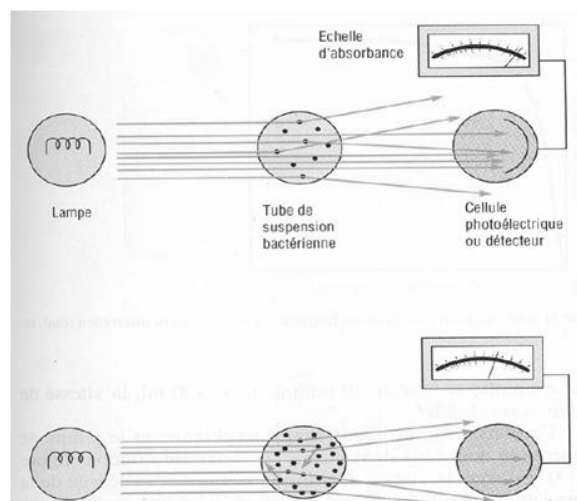
5.1.4 La technique d'épifluorescence

Elle distingue les cellules vivantes des cellules mortes. Elle utilise l'acridine orange, un colorant qui se fixe sur l'ADN. En microscopie sous UV, les bactéries vivantes apparaissent vertes alors que les bactéries mortes apparaissent rouges.

5.1.5 Mesures indirectes de la turbidimétrie

Plus une bactérie pousse dans un liquide plus ce dernier devient trouble. Il y a formation d'un voile.

On utilise un **spectrophotomètre** pour mesurer cette **turbidimétrie** à travers une mesure appelée densité optique (DO) ou Absorbance (A). **La quantité de lumière transmise à une cellule photosensible est inversement proportionnelle au nombre de bactérie.** Plus, il y a de bactéries, plus l'absorbance est basse. On peut tracer des courbes de corrélation entre le nombre de bactéries et l'absorbance. Dans la phase exponentielle, elle est représentée par une droite. (il faut au moins 10^7 bactéries par ml pour pouvoir mesurer une densité optique). Les milieux très colorés ne peuvent être utilisés.



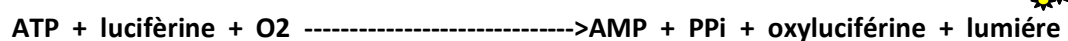
Estimation de la turbidimétrie par spectrophotométrie

5.1.6 Mesure indirecte par la biomasse sèche

Les micro-organismes filamenteux ne se prêtent pas facilement aux techniques décrites ci-dessus. Leur culture en milieu liquide, peut être centrifugée ou bien filtrée, puis **séchée dans un dessiccateur**. On procède ensuite au pesage. Plus la biomasse est élevée plus le nombre de bactérie est grand. Cette technique ne différencie pas les bactéries vivantes des mortes.

5.1.7 Mesure indirecte par l'activité métabolique

On peut suivre la variation du pH, la consommation d'oxygène, de l'ATP par le test de la luciférase. **L'ATP-métrie** correspond à la réaction suivante.



La quantité de lumière émise est inversement proportionnelle à la croissance des bactéries. Elle peut être mesurée grâce à un luminomètre. (1pgATP \approx 1 000 bactéries).

5.2 Paramètres de la croissance

Ces paramètres sont appelés également constantes de la croissance.

La division cellulaire répond une progression exponentielle à temps régulier. 01 cellule donne 02 cellules, qui donnent 04 cellules, puis 16, puis 32 et ainsi de suite.

Le temps nécessaire au doublement du nombre de cellules est appelé **temps de génération (G)**.

Le temps de génération **est spécifique à chaque espèce** et il dépend des conditions environnementales.

(G) est de 20 minutes pour *Escherichia coli*, de 1000 minutes pour *Mycobacterium tuberculosis*.

Calcul du nombre de génération (phase exponentielle)

Soit N= nombre de cellule en division au temps (t) et N₀ le nombre de bactérie initial

Après 1 division : $N_1 = 2^1 \cdot N_0$

Après 2 divisions : $N_2 = 2^2 \cdot N_0$

Après n division : $N_n = 2^n \cdot N_0$

Donc $\text{Log} N = \text{Log} 2^n \cdot N_0 = n \text{Log} 2 + \text{Log} N_0$

donc $n = \frac{\text{Log} N - \text{Log} N_0}{\text{Log} 2}$

Le temps de génération $G = t_n - t_0 / n$

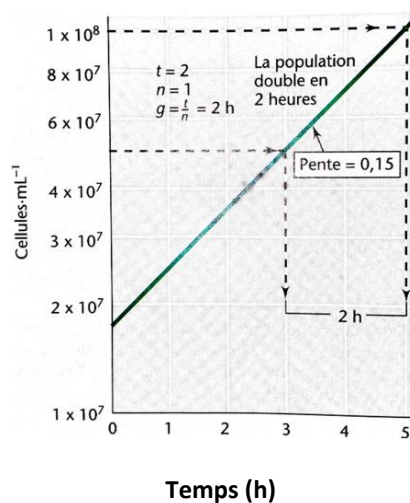
Ainsi par e, si une population bactérienne croît de 10^3 à 10^9 /ml en 10h.

$$n = (\text{Log} 10^9 - \text{Log} 10^3) / \text{Log} 2 = 6 / 0.3 = 20 \text{ divisions}$$

$$G = 10 / 20 = 0.5 \text{ h} = 30 \text{ mn}$$

Le temps de génération peut être calculé en fonction de la pente de la représentation semi-logarithmique.

Soit l'exemple suivant :



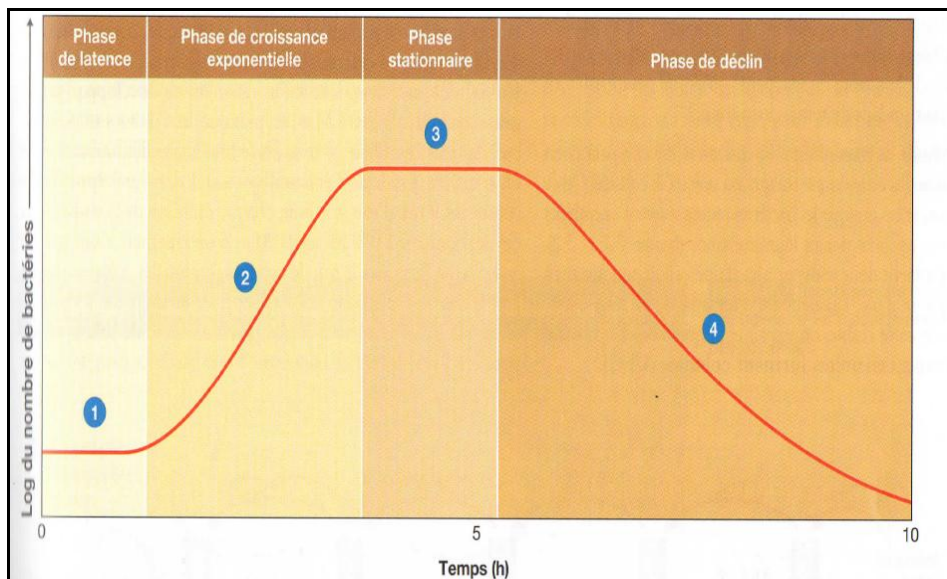
$$\text{La pente} = \frac{\text{Log} 2 \cdot n}{t} = 0,301 \cdot 1 / 2 = 0,15 = \frac{\text{Log} 2}{G} \quad \Rightarrow \quad G = \frac{\text{Log} 2}{\text{pente}} = 0,301 / 0,15 = 2 \text{ h}$$

$$\frac{\text{Log} 2 \cdot n}{t} = 0,301 \cdot \frac{n}{t} = (k) \text{ Taux de croissance spécifique} = 0.15.$$

Enfin, $1/G$ représente le taux de division (h^{-1}) et noté ν (nombre de division par unité de temps lors d'une croissance discontinue)

5.3 Courbe de croissance en milieu non renouvelé, culture discontinue

Dans une culture discontinue ou la croissance n'est pas synchrone et où les nutriments s'épuisent avec le temps, la croissance suit une courbe à **04 phases**. La phase de **latence**, la phase de **croissance exponentielle**, la phase **stationnaire** et la phase de **déclin**.



Courbe de croissance bactérienne

La phase de latence

Le taux de croissance (k) est égal à zéro. Les bactéries ne se divisent pas, mais s'adaptent aux conditions de leur milieu environnemental. Elles synthétisent les enzymes nécessaires spécifiques des substrats (nutriments) présents.

Si on inocule le même milieu avec des bactéries prélevées en phase exponentielle, il n'y aura pas de phase de latence.

La phase de croissance exponentielle

Les cellules bactériennes se divisent sans arrêt, tant que les nutriments sont disponibles et les substances toxiques absentes et le pH est optimal. Le taux de croissance (k) est maximal. L'état physiologique est maximal également.

La phase stationnaire

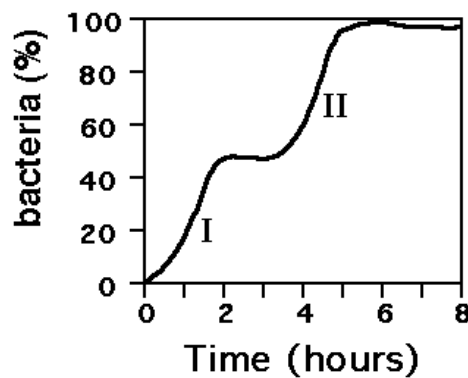
Lorsque la culture est faite dans un flacon ou un tube, à un moment donné, les nutriments s'épuisent, les produits toxiques s'accumulent et le pH change. Le nombre de cellules ne varie plus. Il y a autant de division que de mort cellulaire. Le taux de croissance (k) est constant. On parle même d'une **croissance cryptique**, où des cellules se nourrissent du contenu libéré par des cellules mortes.

La phase de déclin

Les bactéries ne se divisent plus. Elles meurent par lyse cellulaire. Le taux de croissance (k) est négatif.

5.3.1 Phénomène de diauxie (deux croissance en grec)

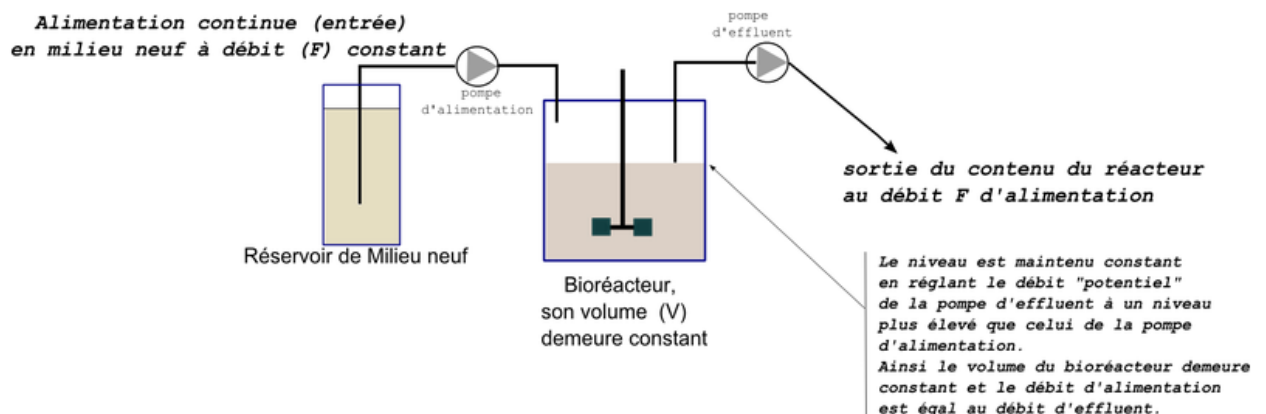
Le phénomène de diauxie, est une croissance qui se traduit par une courbe biphasique. Cette croissance est observée lorsqu'on utilise un milieu synthétique contenant deux sources de carbone. Dans un milieu contenant du glucose et du lactose, les bactéries vont utiliser en premier le glucose grâce à des enzymes constitutives. La dégradation du lactose est sous la dépendance d'enzymes inductibles dont l'induction est réprimée en présence de glucose. Lorsque le glucose est consommé, les bactéries utiliseront le lactose et initieront une nouvelle phase de croissance exponentielle après un temps de latence adaptatif.



Phase I (Glucose) –Phase II (Lactose)

5.3.2 Les Cultures continues

Dans un milieu non renouvelé, la phase de déclin est vite atteinte. Cela crée des problèmes pour les bioindustries. **Du point de vue économique**, il est très important de prolonger la phase exponentielle plusieurs jours. La solution est de renouveler constamment le milieu de culture et en récupérant les produits du métabolisme et les déchets. Les croissances continues sont obtenues à l'aide de chemostat et d'autres équipements plus complexes. Le principe du chemostat repose sur le contrôle indépendant, du taux de croissance et de la production de biomasse. Cela est possible en jouant sur le taux de dilution et la concentration des nutriments. Le système est constamment agité et alimenté en air stérile.



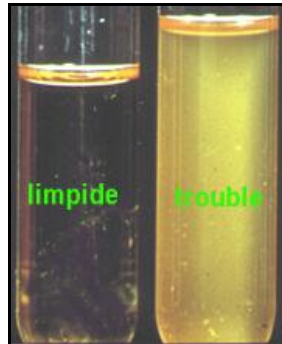
Principe du chemostat

5.4 Culture bactérienne

Une préparation nutritive qu'on prépare au laboratoire pour cultiver les micro-organismes est appelé **milieu de culture**. Les bactéries introduites dans le milieu de culture constituent **l'inoculum**. Les micro-organismes qui s'y développent forment **une culture**.

Classification des milieux selon la consistance

Selon les analyses et les expériences à effectuer, on peut cultiver des bactéries sur **des milieux liquides** qu'on appelle **bouillons de culture**. Si on rajoute de **l'agar-agar** (polysaccharides isolés des algues), **on obtient des milieux solides**. Les micro-organismes se développent sous forme **d'un trouble ou voile** en suspension.



Croissance sur milieux de culture liquide

Les milieux solides peuvent être préparés **sur boîte de Petri** ou **en tube** (**gélose inclinée**, **gélose profonde**). Selon la quantité d'agar rajoutée, on a des **géloses solides** (1,5%) et des **géloses molles** (0,75%). Il est déconseillé de dépasser 1,5% car cela pourrait inhiber la croissance de certaines bactéries à cause **d'une forte pression osmotique**.

Les bactéries se développent sous forme de colonies, dont la forme, la couleur, l'odeur, dépendent à la fois de l'espèce et du milieu utilisé. La colonie **s'agrandit radialement** avant de pousser **verticalement** à une taille et une hauteur limites.

L'agar fond lorsqu'on la réchauffe à 100°C et se solidifie lorsqu'elle se refroidit (dès 40°C). Généralement, on prépare les boîtes de Petri avec une gélose stabilisée à 50°C.



Colonies de différents micro-organismes sur gélose

Culture spéciales et bactéries non cultivables

D'autres bactéries sont dites non cultivables. En réalité, **il faut dire que l'on ne sait pas encore cultiver à ce jour**. Beaucoup d'entre elles sont identifiées uniquement sur la base de leur **ARNr 16S**.

En microbiologie clinique, l'agent de la lèpre, *Mycobacterium leprae* est cultivé **dans un petit animal appelé Tatou**. Enfin, les bactéries intracellulaires obligatoires (Rickettsies, Chlamydias), sont cultivées **dans des cellules mammifères en monocouches**.

Les anaérobies stricts ont besoin de milieux réducteurs et d'équipements spéciaux comme **la jarre anaérobie ou une hôte anaérobie étanche**, dont l'air est contrôlé.

Classification des milieux de culture selon la composition chimique

Selon le type trophique de la bactérie et de ses exigences, **il faudrait adapter** la composition et le pH.

On a développé différentes catégories de milieux de cultures :

Les milieux synthétiques

On connaît avec exactitude la composition chimique de type de milieu, qualitativement et quantitativement. Ils sont constitués chimiquement, de corps purs. Ils sont utilisés pour les bactéries autotrophes ou des tests bien précis.

Exemple : Milieu **urée – indole** (L-tryptophane (0,3 g), KH_2PO_4 (0,1 g), K_2HPO_4 (0,1 g), NaCl (0,5 g), urée (2 g), alcool à 95 (1 ml), rouge de phénol 1%, eau distillée (100 ml).

Les milieux complexes ou empiriques

Très nutritifs de composition indéfinie. Utilisés pour la culture de nombreux organismes. Se sont les plus appropriés. Employés pour la culture des chimiohétérotrophes.

Ils sont constitués d'extrait de soja, de viande, de levure, digérés par des enzymes. Ils fournissent une source de carbone, d'azote, vitamines B. Leur composition varie d'un lot à l'autre. Ils sont préparés par macération ou par décoction. Exemple : bouillon nutritif (Peptone (5g), extrait de bœuf (3g), NaCl (8g), Eau distillée (1 litre)).

Les milieux semi-synthétiques

Comme leur nom l'indique c'est **un mélange** de composés chimiques purs et de substances naturelles empiriques. Exemple milieu de Chapman, qui est également sélectif pour les Staphylocoques. Peptone (10 g), Extrait de viande de bœuf (1 g) Chlorure de sodium (75 g), Mannitol (10 g), Rouge de phénol (0,025 g), Agar (15 g), Eau distillée (qsp 1 Litre). pH = 7,4.

Les milieux sélectifs

Ces milieux inhibent la croissance de la majorité des micro-organismes et stimulent celles des bactéries qu'on cherche à isoler. On fait intervenir un pH acide, une concentration de sel élevée.

Les milieux différentiels

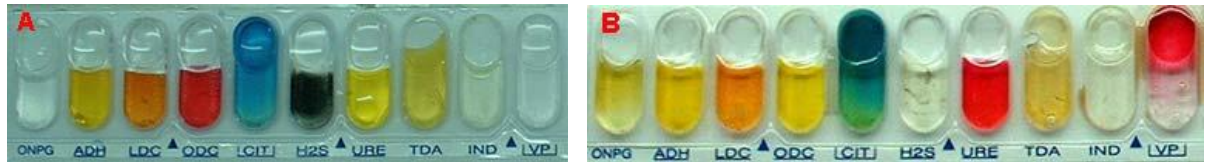
Contiennent un indicateur (colorant) qui permet de différencier deux types bactériens qui poussent sur le même milieu, mais ne dégradent pas tous les deux un substrat particulier. La gélose Hektoën, qui différencie la fermentation de 3 glucides (lactose, saccharose et salicine) ainsi que la production de sulfure d'hydrogène.

Les milieux enrichis

Ils contiennent, outre les composants de base, des composants indispensables aux bactéries, que celles-ci ne peuvent pas synthétiser. Ce sont des milieux utilisés pour l'obtention des bactéries dites *exigeantes* et auxotrophes. Par exemple : les milieux au sang frais.

Les milieux d'identification

Utilisés dans la mise en évidence des caractères biochimiques des bactéries dans l'identification différentielle.



Activité enzymatique micro méthodes (API)



Activités fermentaires micro méthodes (API)

Les milieux de conservation

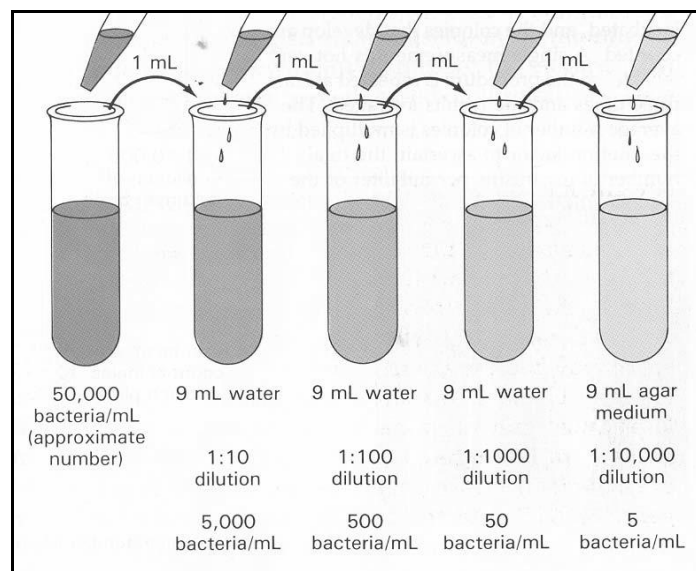
Se sont des milieux pauvres au sein desquels les bactéries survivent dans un état de vie ralentie.

Obtention et conservation des cultures pures

Pour étudier et utiliser des micro-organismes on doit obtenir **des souches pures (culture pure)**

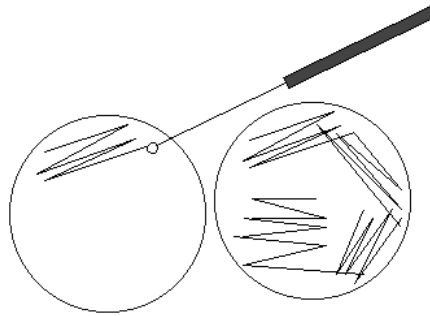
On peut utiliser pour cela deux techniques, par dilution en milieu liquide et par épuisement en milieu solide.

Dilution en milieu liquide : Le produit d'où l'on veut isoler la souche est dilué de 10 en 10 dans un milieu stérile.



Epuisement en milieu solide (La méthode des stries)

A l'aide d'une anse de platine stérilisée, on dépose une petite quantité de milieu à la périphérie d'un milieu solide, coulé en boîte de Petri. Puis on réalise des stries serrées vers le centre de la boîte et ceci par moitié, après incubation, on obtient des colonies isolées là où le dépôt a été épuisé.



Isolement par stries parallèles serrées à l'aide d'une anse de platine

Conservation des souches pures

Les souches pures peuvent être conservées à température ambiante en tube **sur géloses inclinées**, par **lyophilisation** dans des ampoules scellées, ou par **congélation** en présence de glycérol (40%). La congélation est la meilleure façon de procéder pour le long terme.

5.5 Agents antimicrobiens

Introduction

Au cours du 20^e siècle, les scientifiques ont développé une série de méthodes physiques et chimiques pour lutter et contrôler la croissance des micro-organismes. Tous ces efforts étaient dans un cadre de pratique médicale pour diminuer le pourcentage de décès post chirurgicaux ou après des accouchements. L'altération des aliments et le développement d'approches efficaces pour leur conservation constituaient également une motivation d'ordre sanitaire et économique.

A. Définitions

La stérilisation : est l'action de tuer toutes les formes de vie microbienne contenues dans une préparation ou présents à la surface d'un objet. Le matériel traité est dit stérile lorsqu'aucun micro-organisme ne peut être revivifié.

Il faut souvent emballer les objets avant leur stérilisation et bien fermer les préparations pour éviter la contamination postérieure.

La désinfection : est une mesure qui a comme objectif de détruire les microbes pathogènes. Elle est inefficace sur les endospores. Elle utilise un produit chimique qu'on nomme **désinfectant** sur des produits inertes. C'est une opération **au résultat momentané**. Elle détruit les microbes présents, mais il faut répéter le traitement en cas de contamination postérieure. Si elle est appliquée à un tissu vivant on parle **d'antisepsie** et le produit utilisé est un **antiseptique**. On n'utilise pas les mêmes produits pour les tissus vivants et les objets inertes. L'antiseptique doit être non toxique et non irritant pour l'homme ou l'animal.



Désinfectant pour salle de bain



Antiseptique pour la peau

La décontamination : comme la désinfection est une action au résultat non permanent. Elle permet d'inhiber les micro-organismes, sans forcément les tuer. Elle s'applique à des tissus vivants.

L'asepsie est l'ensemble des règles à respecter par les équipes médicales pour éviter l'apport de microbes exogènes.

Selon l'effet de l'agent antimicrobien sur la croissance des micro-organismes, on distingue :

Une action **bactériolytique** avec une lyse (la mort) des cellules. Les nombres de bactéries totales et viables diminuent brutalement

Une action **bactéricide**, les agents se lient à leurs cibles de façon étroite et même si une dilution a lieu, ils ne se détachent pas de leur cible et le nombre de cellules viables diminue sans lyse cellulaire de façon exponentielle en fonction du temps..

Enfin une action **bactériostatique**, si la concentration diminue, la croissance bactérienne reprend. Il peut se détacher de sa cible. Dans des concentrations normales d'utilisation, le nombre totale de bactérie est stable et égale au nombre de bactéries viables

B. Les modes d'action des agents antimicrobiens

Qu'ils soient physiques ou chimiques, ils agissent sur la croissance bactérienne en altérant la paroi, ou la membrane plasmique. En dénaturant les protéines cytoplasmiques ou les acides nucléiques. On distingue 3 classes d'agents antimicrobiens :

- Les agents physiques
- Les agents chimiques
- Les agents chimio-thérapeutiques

5.5.1 Les méthodes physiques

A. La température

Elle peut être utilisée pour la **conservation** des aliments soit par le froid (**réfrigération, congélation**) soit par la chaleur (**la pasteurisation**). Dans les deux cas, le nombre de micro-organismes est stabilisé par le ralentissement de la croissance.

La température permet également de **détruire** les micro-organismes (stérilisation, appertisation). Son action dépend du milieu, de la physiologie et du nombre de cellules.

Les destructions thermiques utilisent la **chaleur humide ou la chaleur sèche**.

Chaleur humide (stérilisation)

L'appertisation, méthode fiable, efficace et simple. Développé par Nicolas Appert en 1785 et confirmé par Pasteur en 1801. Consiste à plonger des légumes enfermés hermétiquement dans des bouteilles, dans de l'eau bouillante. Cette approche est très utilisée dans l'industrie des conserves.

L'autoclave, est une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle on chauffe de l'eau sous pression (120°C à 1 atm) pour faire agir la vapeur d'eau pressurisé, pendant 15 à 20 minutes. La stérilisation est obtenue par dénaturation des protéines. Il y'a plusieurs modèles d'autoclaves de tailles et de formes différentes.



Autoclave de laboratoire

La tyndallisation

Il est possible d'arriver à stériliser les matières fragiles, très altérables par la chaleur, en leur faisant subir une série de chauffages à température moins élevée (60°C), séparées par des périodes de repos à la température ordinaire. C'est la tyndallisation. Elle est utilisée pour éliminer les endospores qui ont réactivées en cellules végétatives, éliminées à chaque cycle de chauffage.

La pasteurisation

Développée par Pasteur entre 1866 et 1876. Un chauffage pas très élevé (60°C) permet de détruire la flore pathogène (Salmonella, Listeria, Escherichia...) et ralentie la croissance des germes d'altération. Elle préserve les qualités nutritives de l'aliment (lait), l'équilibre chimique et les vitamines.

La pasteurisation ne peut être considérée comme une stérilisation, on l'applique à des produits pour préserver les caractères organoleptiques, (gout, couleur, odeur, saveur) et en permettant leur conservation pendant une période. On distingue :

- La pasteurisation haute température** : Le lait est porté à 90°C pendant 30 secondes puis refroidi à 10°C.
- La pasteurisation basse température** : Chauffage à 60 à 70°C pendant des temps plus longs.
- La pasteurisation Ultra Haute Température (UHT)** : La plus récente, elle est appliquée au lait et au jus de fruit. Une température de 140°C pendant quelques secondes, puis on refroidit brutalement.

La chaleur sèche

Les objets (verrerie, matériel chirurgical), ne peuvent être stérilisés par la chaleur humide. Il faut utiliser le **four Pasteur ou Poupinel** à circulation d'air pour une bonne répartition de la chaleur.

La stérilisation est obtenue par une dénaturation des protéines : **180°C (30 mn) - 170°C (1h) - 160°C (2h)**.

Action du froid

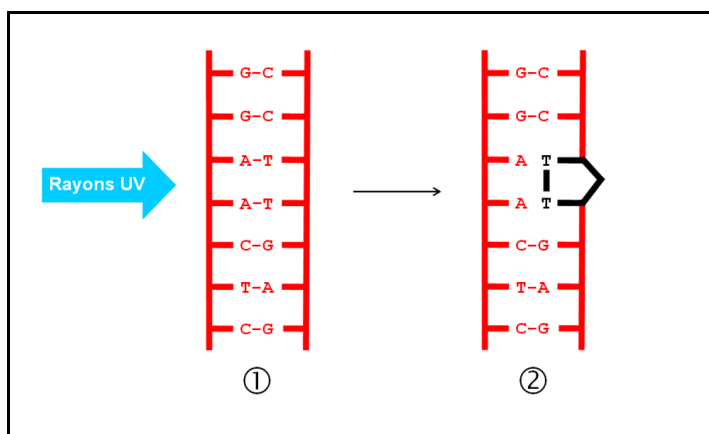
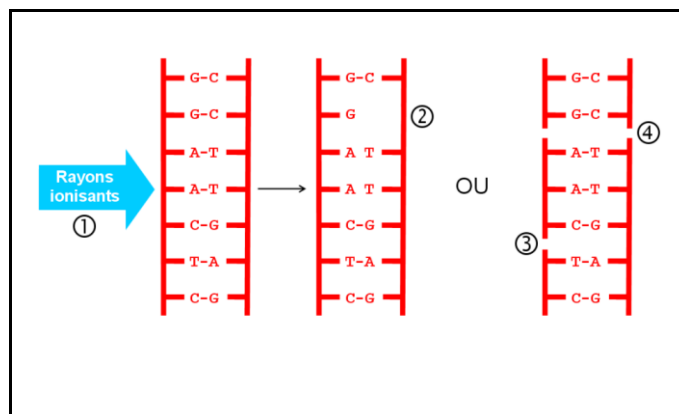
L'activité de l'eau est grande lors de la réfrigération (développement des psychrophiles), par contre la congélation la diminue. Les 3 règles à respecter dans l'application du froid :

- Il faut réfrigérer un aliment sain
- Le plus tôt que possible (rapidement)
- La réfrigération doit être continue (aucune rupture dans la chaîne du froid)

B. les radiations

On a les **rayonnements ionisants** comme les rayons gamma, les rayons X et les faisceaux d'électrons. Ils ont une longueur d'onde très petite et ils transportent plus d'énergie. L'énergie agit sur l'eau des cellules qui sera ionisée avec formation d'ions hydroxyles qui agissent sur l'ADN en le modifiant chimiquement ou en le coupant.

Les rayonnements non ionisants comme les ultraviolets, surtout ceux dont la longueur d'onde est de 270 nm. Ils provoquent la formation de liaisons anormales entre des bases de thymine proches dans l'ADN. Ceci, va induire des problèmes au niveau de la réplication de l'ADN. Les UV du soleil sont moins puissantes et certaines bactéries utilisent des pigments pour s'en protéger.



C. Pression

Les ultrapressions peuvent détruire les micro-organismes. Elles sont utilisées en recherche pour faire éclater les cellules « **french press** ». En industrie alimentaire, on utilise la **Pascalisation**, associée au traitement par la température. Confiture et jus de fruit sont traités par pasteurisation à basse température, avant de subir un traitement de 10 à 30 mn sous 3500 à 6000 bars. On peut congeler des aliments à -20°C sans formation de glace. L'eau reste liquide à -20°C sous 2000 bars.

D. Elimination mécanique

La **filtration** est le meilleur moyen pour stériliser des solutions renfermant **des substances thermolabiles**, comme des protéines, vitamines, sérum, ATB... La filtration stérilisante est appelée stérilisation à froid. Il y a différents dispositifs de filtrations selon les volumes traités.



Filtre pour seringue



Unité de filtration

5.5.2 Les méthodes chimiques

Ils sont très actifs mais toxiques pour l'homme. Ils ne peuvent être ingérés.

L'activité est très diverse. Leur **action est brutale et non spécifique** (à la différence des ATB).

On distingue :

Oxydation et dénaturation des protéines : L'eau oxygénée oxyde les SH libre des enzymes, les sels de métaux lourds se combinent aux SH et inactivent les protéines. L'alcool agit comme la chaleur et coagule les protéines

Altération de la membrane cytoplasmique : les agents liposolubles (phénoliques, savons, et surtout détergents) détruisent la membrane plasmique et laissent s'échapper le cytoplasme et ses composants.

Action sur le métabolisme : Les cyanures et les fluorures attaquent la chaîne respiratoire. Les colorants basiques (bleu de méthylène, violet de gentiane, réagissent avec les acides ribonucléiques. D'autres agents sont mutagènes, comme l'acridine, ou chélateurs comme la quinoléine et ses dérivés. On a isolé des plasmides de résistance secondaire aux antiseptiques.

Comme exemples :

Oxydants : Eau oxygénée, l'eau de javel, l'alcool iodé.

Alcool : Ethanol dilué à 70% (l'alcool diluée et plus efficace que l'alcool pur)

Métaux lourds et leurs sels : Les sels d'argent en ophtalmologie, en ORL. Les sels de mercure comme antiseptique de la peau et des muqueuses (Mercurochrome Mercryl, Merseptyl). **Le sulfate de cuivre** comme

antifongique. Ils tuent la cellule en précipitant les enzymes ou en se combinant aux groupements thiols SH. Ils ont très toxiques pour l'homme.

Phénol et Aldéhydes très toxiques pour l'homme, ils ont bactéricides, fongicides et virucides. Ils dénaturent la membrane, l'ADN et les protéines

Les Savons, leur action est mécanique. Ils augmentent le pouvoir mouillant de l'eau et emprisonnent les germes dans la mousse et les éliminent avec le rinçage. D'autres composés à pouvoir mouillant, très bactéricides ont été synthétisés. Ce sont les **détergents ou surfactants**.

Les colorants, antiseptiques à usage local, quelques-uns sont utilisés par voie digestif. Le vert de malachite et le vert brillant pour le traitement des plaies superficielles, le violet de méthyle comme antiseptique urinaire, le violet de gentiane comme désinfectant. On les utilise dans la préparation des milieux de culture pour leurs actions sélectives. Ils sont souvent plus actifs sur les Gram (+) en sélectionnant du coup les Gram (-) .

Stérilisation par les gaz, on les utilise pour stériliser les produits instables à la chaleur, la désinfection des locaux (hôpitaux), ou la stérilisation des objets en plastique comme les boîtes de Petri et tubes.

5.5.3 Agents chimio-thérapeutiques antimicrobiens

C'est en 1929 avec **Flemming**, que l'ère véritable des antibiotiques débuta. Il observa de façon anodine, l'inhibition de la croissance de Staphylocoques par des moisissures de *Penicillium*, sur une boîte de Petri oubliée sur la pailasse. Il cultiva en masse le *Penicillium* et montra que les extraits étaient bactéricides sans être toxiques pour les cellules animales. Il appela Pénicilline le principe actif du filtrat.

En 1939 Florey et Chain, on purifié la pénicilline à grande échelle et effectué des essais cliniques avec des résultats spectaculaires.

En 1944, Waksman, découvrit la Streptomycine à partir *Streptomyces griseus*

En 1953, Newton et Abraham, La céphalosporine C à partir d'une culture de *Cephalosporium acremonium*.

Depuis 1965, une nouvelle ère débuta, celle des antibiotiques **semi-synthétiques**, tel que les B-lactamines

A. Le principe de la toxicité sélective

Les agents antibactériens chimiques (antiseptiques, désinfectants) : Exercent une action antibactérienne non spécifique. Ils ne peuvent pas être utilisés en thérapeutique par ingestion ou injection, puisque leur action s'exerce sur les micro-organismes, mais aussi vis à vis des cellules de l'homme ou de l'animal. Les agents chimiothérapeutiques (antibiotiques, sulfamides), exercent un effet nuisible sur les microbes mais n'ont **pas d'effet nocif sur les cellules animales et humaines**.

B. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont très nombreux et peuvent être classés selon divers critères :

B.1 En fonction de leur origine

Les antibiotiques naturels ou produits par les micro-organismes : Champignons (Pénicilline, Céphalosporine). Bactéries (Streptomycine, Chloramphénicol, polypeptides).

Les antibiotiques synthétiques ou produits obtenus entièrement par voie chimique : Sulfamides. Acides nalidixiques.

Les antibiotiques semi-synthétiques : Ces antibiotiques sont obtenus à partir d'une fraction moléculaire naturelle sur laquelle a été greffé un radical chimique.

B.2 En fonction de leur spectre d'activité

Le spectre d'activité d'un antibiotique ou domaine d'action est une liste théorique de toutes les bactéries pouvant être inhibées dans leur croissance ou détruites par un antibiotique donné.

Large spectre : Actif sur la majorité des bactéries Gram positif ou négatif.

Spectre limité : Actif sur les bactéries Gram positif et quelques Gram négatif.

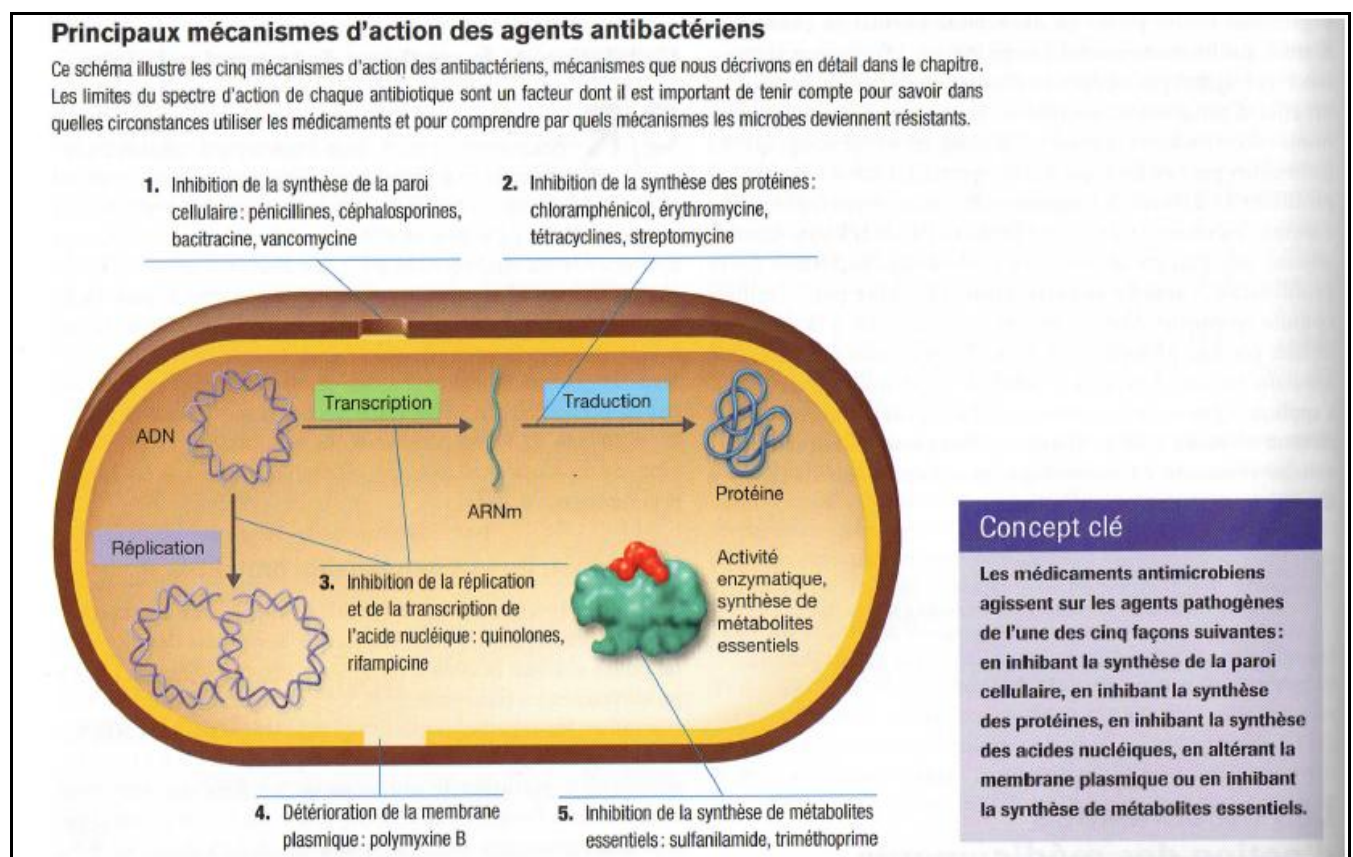
Spectre étroit : Actif uniquement sur certains germes Gram positif ou sur certains Gram négatif ou un genre.

B.3 En fonction de leur parenté chimique

La structure de base commune à plusieurs antibiotiques permet de regrouper ces antibiotiques dans une même famille. Les antibiotiques d'une même famille ont en générale le même mécanisme d'action.

B.4 En fonction de leur site d'action

Le schéma guide suivant résume les 5 différents mécanismes des antibiotiques.



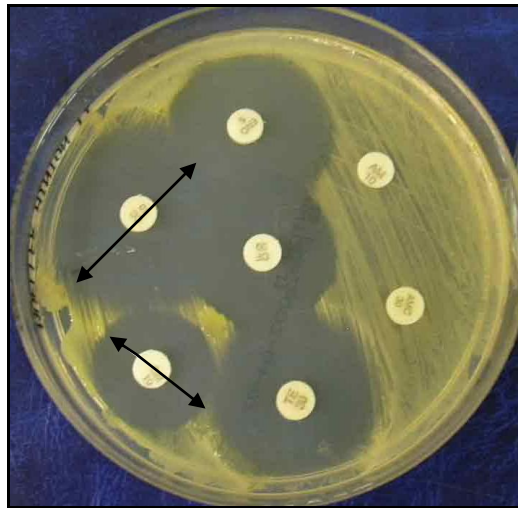
C. L'antibiogramme

Dans les infections graves, récidivantes ou les échecs thérapeutiques on fait appel au laboratoire de microbiologie pour réaliser une culture et un antibiogramme. Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne.

L'antibiogramme standard en milieu gélosé : méthode des disques

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne estensemencée à la surface d'une gélose de **Mueller-Hinton**. Des disques imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la

surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. **La sensibilité** ou **la résistance** de la souche bactérienne sera déterminée.



Antibiogramme : méthode des disques d'antibiotiques

Chapitre 6 : Notion de mycologie et de virologie

6.1 Mycologie (Levure et moisissure)

La mycologie est l'étude des mycètes ou champignons. On distingue trois groupes majeurs de champignons. **Les moisissures (champignons filamenteux), les levures (unicellulaires) et les champignons macroscopiques.** Il y a 1.5 millions d'espèces de mycètes.

Grace à leurs exoenzymes, ils recyclent les parties dures des végétaux. Certains sont symbiotiques et développent des mycorhizes avec les racines des plantes. Ils sont aussi utiles à des insectes pour dégrader la cellulose et la lignine qui leur servira de nourriture. L'homme également s'en sert pour la fabrication de médicament (antibiotiques, vitamines), d'aliment (pain, fromages), d'enzymes...

Les mycètes sont des **eucaryotes saprophytes**. Ils se nourrissent de matières organiques en décomposition qu'ils transforment en matière minérale, par absorption à travers une membrane.

Commensales dans leurs majorité, donc vivant en association symbiotique avec d'autres organismes. Mais certains sont parasites et hautement pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes (causant des pertes économiques considérables aux agriculteurs).

Le type respiratoire est **aérobie**, à l'exception de ceux que l'on trouve dans le tube digestif des mammifères. Les levures sont **anaérobies facultatives**. Du point de vue des facteurs physicochimiques, les mycètes sont **mésophiles**, Température optimale de croissance entre 25 et 35°C. Le maximum observé est de 62°C. Ils tolèrent **des milieux acides** $5.5 < \text{PH} < 7.5$ et ils sont moins exigeant en humidité par rapport aux autres micro-organismes.

Chimiohétérotrophes, ils utilisent la matière organique comme source d'énergie d'électrons et de carbone. Ils oxydent la matière organique pour puiser l'énergie nécessaire à leur développement et croissance. Les molécules simples sont absorbées directement (acide aminé, monosaccharides). Les molécules plus complexes sont hydrolysées à l'extérieur par un équipement enzymatique sécrété ou associé à la paroi.

Les mycètes **ont une paroi**, principalement constituée de 10 à 20% de protéines, 80% de polysaccharides antigéniques : **la chitine** (polymère linéaire de β -D-1-4- N Acétyl-glucosamine), de la cellulose (polymère linéaire de β -D-1-4- glucose) des mannanes ou des glucanes. La majorité, sont **immobiles** à l'exception de quelques espèces aquatiques.

L'appareil végétatif des mycètes est appelé **un thalle**. Le thalle peut être constitué d'une seule cellule (levures). La plupart des champignons ont des thalles pluricellulaires constitués d'un mycélium et d'organes de fructification (les moisissures).

La croissance **est apicale**, elle se fait au niveau de l'apex des hyphes. L'ensemble des hyphes forment **un mycélium**. Les levures sont **unicellulaires** et se reproduisent **par bourgeonnement** mais également **par fission binaire** ou **scissiparité** comme *Schizosaccharomyces pombe*.

Leur cycle vital peut se faire **par reproduction sexuée ou asexuée**. Dans la reproduction sexuée, **les spores** présentent des différences notables en termes de forme, taille et autres caractéristiques, **spécifiques de l'espèce**.

6.1.1 Taxinomie et reproduction des mycètes

Les moisissures et les levures sont classées donc sur **la base de la diversité des cycles de reproduction**, en tenant compte **de la formation de spores sexuées différentes**.

La reproduction la plus répandue se fait sans recombinaison génétique. Les spores asexuées sont produites par une mitose suivie d'une division cellulaire. Elle peut avoir lieu par fragmentation du mycélium (arthrospore), par bourgeonnement d'une cellule mère végétative (blastospores), si elles sont enveloppées, elles sont dites chlamydospores, ou à l'extrémité d'un hyphes: conidiospores. Elles peuvent être formées à l'intérieur d'un sporange : sporangiospores.

La reproduction sexuée implique la formation de gamètes ou cellules sexuelles. Les gamètes de deux thalles fusionnent leur patrimoines génétiques et forme un nouvel individu.

On reconnaît 3 règnes de mycètes, **le règne des Eumycota , des Straminipila et des fongiformes**, selon leur morphologie et leur mode de reproduction.

A. Le règne des Eumycota (champignons vrais) on distingue **5 phylums qui dérivent probablement d'un ancêtre commun choanoflagellés**.

Phylum Chytridiomycota

Phylum Zygomycota

Phylum Glomeromycota

Phylum Ascomycota

Phylum Basidiomycota

B. Le règne des Straminipila comprend 3 phylums qui dérivent probablement d'un groupe de protistes comme les diatomées et certaines algues dorées. Le plus important est celui des Oomycota

Phylum Oomycota

Phylum Hyphochytridiomycota

Phylum Labyrinthulomycota

C. Le règne des fongiformes ou moisissures glaireuses avec 4 phylums

Phylum Myxomycota

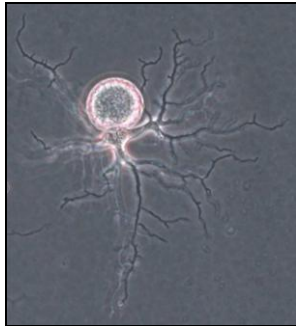
Phylum Plasmodiophoromycota

Phylum Dictyosteliomycota

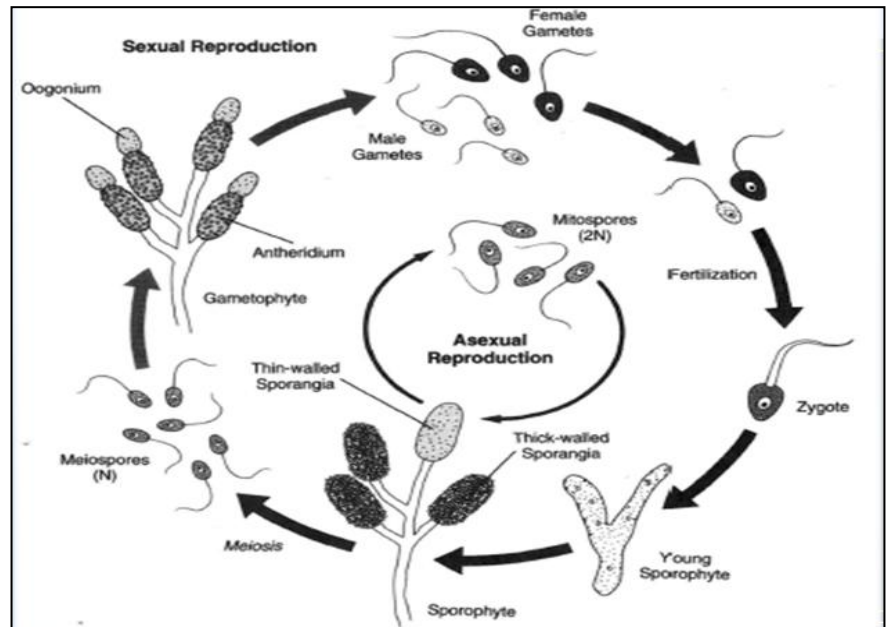
Phylum Acrasiomycota

6.1.1.1 Phylum des chytridiomycètes

Ce sont des champignons inférieurs, le mycélium n'est pas septé (sauf dans des structures en cours de reproduction). Les Chitrides produisent des zoospores dans des sporanges. **Les zoospores sont mobiles généralement par un flagelle.** La reproduction sexuée se fait par la formation d'une spore diploïde après la fusion de 2 cellules haploïdes ou la fusion d'un gamète haploïde avec un œuf immobile. La spore peut subir une méiose et produit un mycélium haploïde ou germer et produire un mycélium diploïde. Le mycélium diploïde peut donner naissance à des sporanges, qui après méiose forment des zoospores haploïdes qui germent en mycélium végétatif haploïde.



Chytridiomycètes

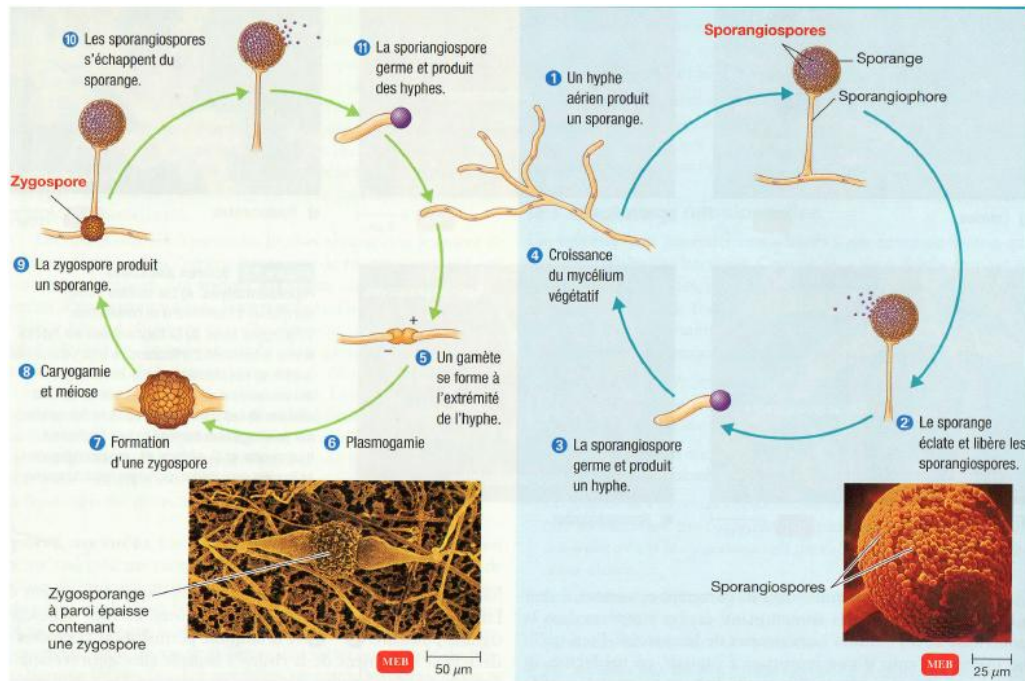


Cycle biologiques des chytridiomycètes

6.1.1.2 Phylum des zygomycètes

Lors de la reproduction asexuée, il y'a formation d'un hyphe aérien, l'extrémité du hyphe est appelée **spongiospore**, elle est séparée de l'hyphe par un septum appelé columelle. Les éléments contenus dans le cytoplasme de l'extrémité d'un hyphe se transforment **en sporange** contenant de nombreuses **spores asexuées**. Les spores contiennent des noyaux haploïdes issus de division mitotique d'un noyau du mycélium végétatif. La dissémination se fait par l'intermédiaire de l'eau et le vent.

Dans la reproduction sexuée, deux noyaux de signes contraires fusionnent dans une structure appelée **zygospore**. Si c'est le même mycélium (homothalisme) si deux mycéliums distincts (hétérothalisme). La fusion se fait au niveau des extrémités différentes des hyphes, appelées progamétanges et donne la zygospore. Après une méiose, 3 noyaux dégénèrent et un seul reste pour donner le mycélium végétatif. Il y'a formation de nouvelles spongiospores à partir de la zygospore.



Cycle biologique des zygomycètes

6.1.1.3 Phylum des Glomeromycètes

Ils ont été récemment définis par la comparaison des séquences de l'ADN ribosomal. Il inclut essentiellement des espèces qui vivent en association obligatoire avec des plantes ainsi qu'une espèce vivant en association avec des cyanobactéries, **Geosiphon pyriforme**. Ils jouent un grand rôle écologique en formant les mycorhizes avec 90% des arbres.

6.1.1.4 Phylum des ascomycètes

Ils produisent des mycéliums complexes avec des septums perforés. Ils produisent des conidiospores asexuées et des ascospores sexuées dans des structures saciformes appelées **asque**.

La reproduction végétative ou asexuée s'accompagne par la production de spores appelées conidiospores à l'extrémité des hyphes aériens appelés **conidiophores**.

Si les spores sont séparées par des parois transversales, on obtient des **arthrospores**, si c'est un bourgeonnement de la cellule mère, on obtient la formation de **blastospores**.



Reproduction asexuée par conidiogénèse thallique



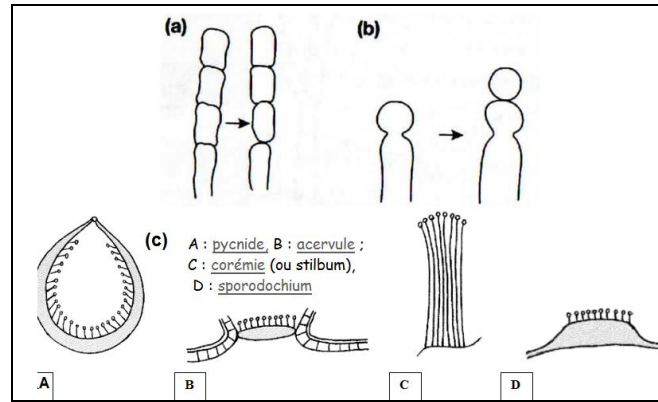
Reproduction asexuée Par conidiogénèse blastique

Les **conidiophores** peuvent s'agréger sous différentes structures en forme de tiges :

Les spores non protégées, à leur sommet : **Coremie**

Protégées dans des tissus mycéliens stériles : **Picnide**

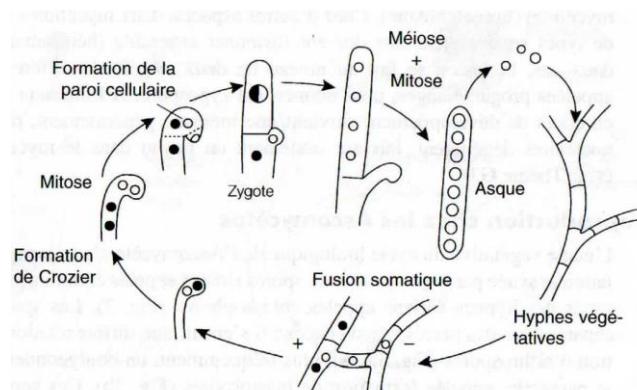
Dans des tissus végétaux, dans l'épiderme des plantes : **Acervule**



(a)Arthospores ou spores thalliques (b)Blastospore, ou spores Blastiques.

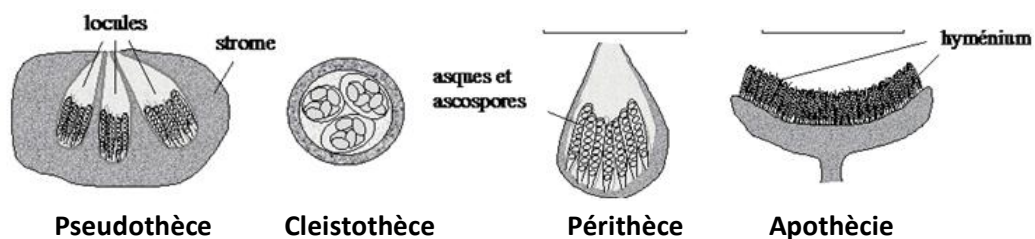
(c)Aggrégation de conidiophores ou hyphes aériens.

La reproduction sexuée a lieu par une union somatique de deux mycéliums de sexe différent. Une courte phase diploïde est suivie par la formation d'ascospores à l'intérieur d'asques sacciformes. Les hyphes se courbent pour donner des structures appelées « **croziers** » ou bâton de bergers qui possèdent des septums distincts à leur base, permettant la présence des 2 noyaux de sexe différent dans une cellule terminale. La formation du septum est coordonnée avec la division nucléaire, qui aboutit à la formation d'un asque.



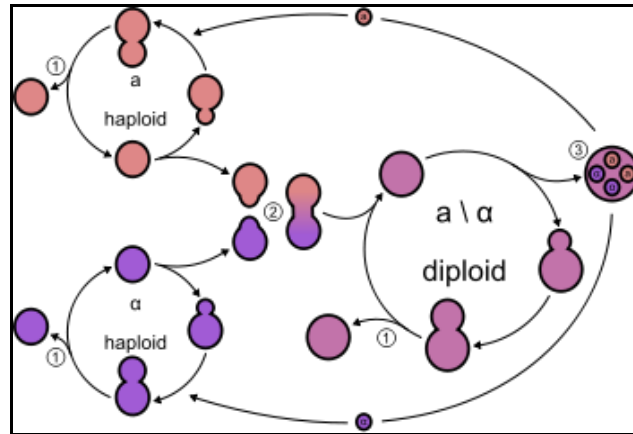
La reproduction sexuée chez les ascomycètes

Chez les ascomycètes plus complexes, plusieurs asques se forment en même temps, se qui forme un tissu fertile appelé hyphénium. Ces hyphéniums peuvent être entourés d'une grande quantité de mycélium végétatif au point qu'ils sont visibles à l'œil nu. Ces appareils sexuels protègent les asques et contribuent dans leurs dispersions.



Différents appareils sexuels des ascomycètes.

La levure, mycète unicellulaire, est également un ascomycète. *Saccharomyces cerevisiae* est l'exemple type. Elle possède deux modes de reproduction, asexuée et sexuée. Les cellules diploïde bourgeonnent et donnent des individus identiques. Si le milieu devient pauvre en azote et en carbone, un diploïde a/α , subie une méiose et donne un asque qui va libérer des spores a et des spores α (haploïdes). Ces spores peuvent se reproduire par bourgeonnement individuel et dès que les conditions redeviennent favorables, une cellule (a) peut fusionner avec une cellule (α) et reformer une cellule diploïde.



Cycle vital d'une levure comme *Saccharomyces cerevisiae*

Parmi les ascomycètes nous considérons un large groupe de champignons vrais qui ne possède pas de reproduction sexuée (inconnue ou rare) et qui produisent des conidies. On les regroupe sous le nom de champignon imparfait ou deutéromycètes. La mitospore est un autre nom à la conidie parce qu'elle est produite de manière asexuée par le seul processus de mitose. Un champignon **anamorphe** (ne se reproduisant que par conidies) peut donc être également dit **mitosporique**.

Par opposition, les champignons qui possèdent une reproduction sexuée sont dits **téléomorphes** et ceux qui ont les deux types de reproduction au sein d'une même colonie fongique, sont dits holomorphes.

Parmi ces mitosporiques on a comme exemple un champignon très dangereux *Aspergillus niger*, un producteur d'antibiotique, *Penicillium*, *Fusarium*.

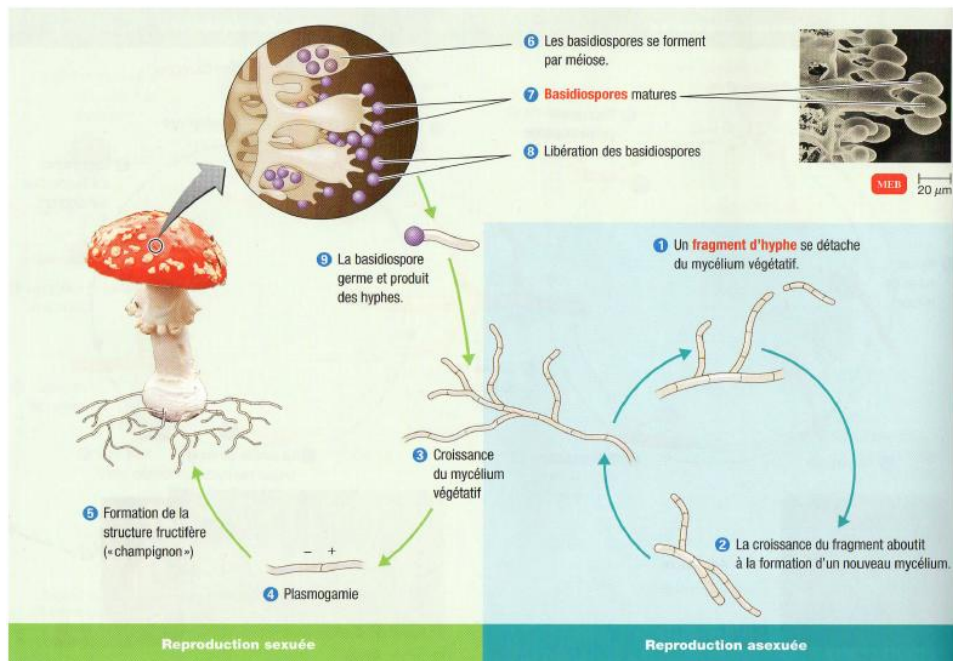
6.1.1.5 Phylum des basidiomycètes

Elles sont dits **mycètes à massue**. Leur hyphe est complètement cloisonné par des septums. La forme en massue est appelée **baside**, à l'extrémité de l'hyphe, d'où sont émises les **basidiospores**. La majorité, sont phytopathogènes (la rouille du blé, le charbon des céréales). Mais, les champignons à chapeau font partie de ce groupe.

Les basidiomycètes produisent rarement des spores sexuelles. Ils sont souvent sous la forme de mycélium végétatif. La reproduction asexuée a lieu lorsqu'un fragment de l'hyphe se détache et forme un nouveau mycélium.

La reproduction sexuée passe par la formation d'un stade dicaryote issue de la formation de deux noyaux de sexe différent suite à la fusion de deux mycéliums compatibles. C'est les conditions environnementales qui conditionnent l'initiation des spores sexuelles. Les mycéliums se disséminent et donnent des basidiums.

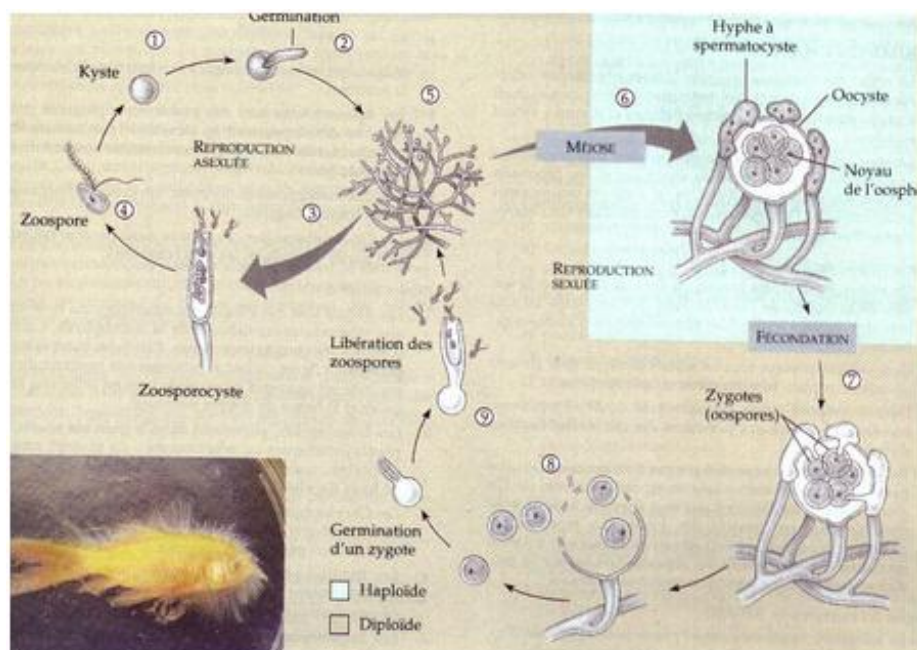
Quatre spores bourgeonnent au niveau du basidium. Les basidiums se regroupent pour former des hyphéniums, très sensibles à la présence de l'eau.



Cycle vital d'un basidiomycète

6.1.1.6 Phylum des oomycètes

Se sont des moisissures aquatiques formant **des hyphes coenocytiques**. Phytopathogènes importants, avec comme maladies de références, **le mildiou de la pomme terre, la rouille de la pomme de terre et des maladies de poissons**. Ils se comportent comme des champignons vrais, mais ils possèdent des caractéristiques des plantes en étant non photosynthétiques. Un noyau diploïde, une paroi cellulosique, des stérols de plante au niveau de la membrane au lieu d'ergostérol des mycètes, des citernes de golgi plates et celles des mitochondries tubulaires (inversées pour les mycètes).



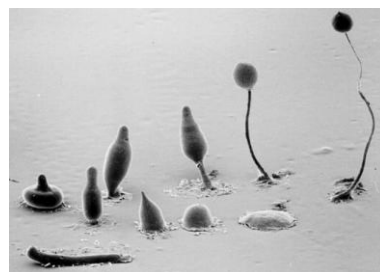
Cycle vital d'un oomycète

La reproduction sexuée des oomycètes, commence par les spores enkystées qui se posent sur un substrat favorable et germent. Puis se forme un réseau d'hyphes cénocytique. A l'extrémité des hyphes se forment des zoosporocystes tubulaires qui relâchent des **zoospores à deux flagelles** et qui vont s'enkyster.

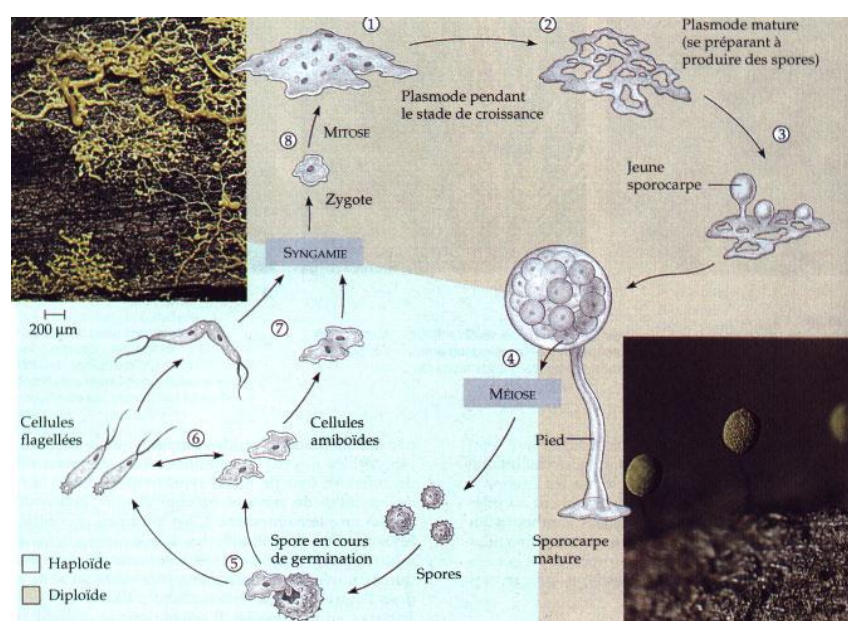
Les hyphes peuvent entamer une reproduction sexuée en formant des structures sexuées. La méiose produit des oosphères à l'intérieur des oocystes et des hyphes à spermatocystes (**antheridium ou anthéridie**) sur le pourtour de l'oosphère. Les hyphes vont déposer leurs noyaux dans les oosphères. Cette dernière se désintègre et libère les oospores. Les oospores vont germer pour libérer les zoospores qui vont générer un nouvel hyphe.

6.1.1.7 Les organismes fongiformes

Ce sont des moisissures visqueuses, aquatiques dites glaireuses. Elles ne ressemblent aux champignons que par leur aspect et leur mode de vie, **mais ils se rapprochent plus des amibes** par leur reproduction et leur cycle biologique. Les moisissures glaireuses peuvent produire des spores et entamer un cycle vital. Par contre, comme les protozoaires, elles sont mobiles et se déplacent rapidement sur les substrats qu'elles colonisent. On distingue, les **moisissures glaireuses cellulaires** avec une forme végétative amiboïde et les moisissures glaireuses acellulaires dont la forme végétative est une **masse protoplasmique appelée plasmode**. Les myxomycètes se nourrissent des bactéries et on vient de montrer récemment qu'elles sont capables de cultiver des bactéries pour des raisons encore inconnues.



Moisissure glaireuse cellulaire (*Dictyostellium discoideum*)



Cycle vital d'une moisissure glaireuse acellulaire (myxomycètes)

6.1.2. Morphologie

Les levures sont des champignons unicellulaires, de forme arrondies, ovale ou même triangulaire. Alors que les moisissures sont pluricellulaires et parfois coénocytiques. Les levures ne forment pas de mycélium et sont souvent associées en agrégats. Les moisissures sont des champignons filamenteux de forme mycélienne.

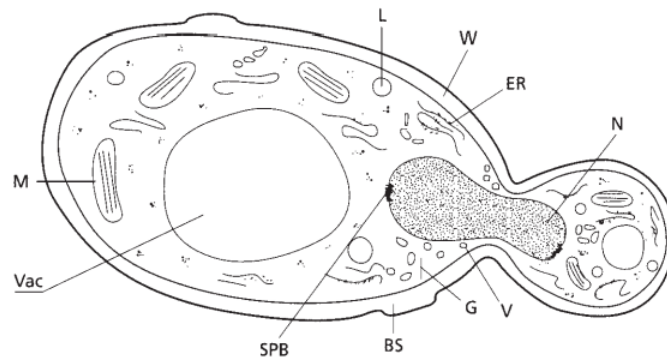


Schéma d'une Levure bourgeonnante

M : mitochondrie, Vac : vacuole, L : corps lipidiques, BS : cicatrice de bourgeonnement, ER : reticulum endoplasmique, N : noyau, W : paroi, G : Golgi, V : visicule.

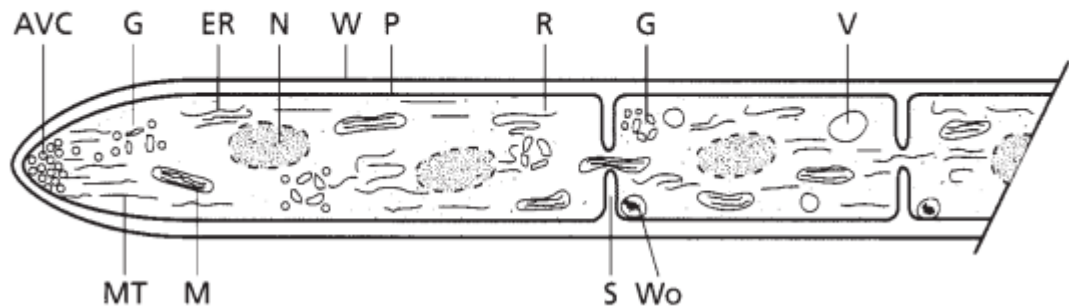


Schéma d'un hyphe de champignons

AVC : vésicule apicale, G : golgi, N : noyau, W : paroi, ER : réticulum endoplasmique, P : membrane plasmique, R : polysomes, V : vacuole, S : septum, Wo : corps de Woronin (de nature protéique).

Certains champignons sont dimorphiques et qui selon les conditions du milieu peuvent être sous forme de levure ou de moisissure (mycélium). Ce sont souvent des champignons très pathogènes, comme *Histoplasma capsulatum*. *In vitro* il est sous forme mycélienne, alors qu'*in vivo* il est sous forme de levure.

Les moisissures se présentent sous la forme de filaments enchevêtrés et ramifiés tel que les branches d'un arbre. Ces filaments sont appelés **hyphes**.

L'ensemble des hyphes d'un mycélium constitue **un thalle**. D'où le nom de **thallophytes**.

L'hyphe constitue la base du mycélium et se présente sous la forme d'une paroi cellulaire entourant le cytoplasme et ses inclusions.

On distingue **les thalles siphonnés**, donc pas de cloisons (Champignons inférieurs coénocytiques) et **les thalles cloisonnés** par une septation transversale de la paroi (champignons supérieurs).

Il faut noter que les septums restent perforés pour permettre la communication entre les différents compartiments de l'hyphe. Si l'hyphe est blessé, **les corps de Woronin** bouchent les septums pour protéger le contenu cytoplasmique.

6.2 Notion de virologie

Introduction

Le premier virus découvert est celui de la mosaïque fluide du tabac. Ivanovski démontre en 1892 qu'un extrait de feuille malade reste infectieux après filtration à travers un filtre. Les bactéries sont retenues par ces filtres, mais autre chose passe à travers le filtre. Un nouveau monde est découvert : **les agents pathogènes filtrants**. Beijerinck, en 1898, sera le premier à appeler « **virus** », l'agent causal de la mosaïque du tabac.



Filtres de Chamberland en porcelaine

Les virus ont une structure composés de deux ou trois éléments. Ils ne sont pas considérés comme des organismes vivants. A l'extérieur de l'hôte, **c'est une structure acellulaire**, incapable d'effectuer le moindre métabolisme. Du point de vue médical, les virus une fois à l'intérieur de l'hôte, deviennent très actifs et ils prolifèrent comme les bactéries, les mycètes et les protozoaires. Donc, du point de vue clinique on considère qu'ils sont vivants.

Les virus ne possèdent qu'un seul type d'acides nucléiques (ADN ou ARN), renfermé dans une coque protéique. Dans la cellule hôte, ils détournent le métabolisme énergétique à leur profit pour synthétiser de nouveaux virions.

Du point de vue thérapeutique, vu que le virus n'ont pas ou très peu, d'enzymes spécifiques, les traitements antiviraux sont également toxiques pour l'homme et l'animal.

6.2.1 La spécificité ou spectre d'hôtes cellulaires

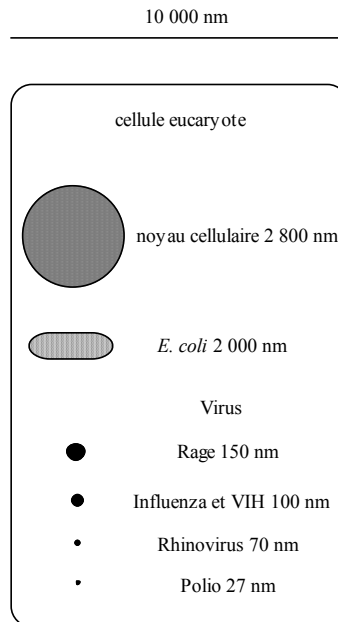
C'est l'ensemble des cellules qu'un virus est capable d'infecter. La majorité infectent un type spécifique de cellules, voir d'une espèce particulière.

Ce concept de barrière d'espèce est tombé avec la grippe et ses différents virus. Le virus humain H3N2 est transmissible au porc. Le virus H7N7 de la grippe aviaire (oiseaux) est transmissible également au porc. Ce dernier possède son propre virus H1N1 (grippe porcine). Des recombinaisons entre les trois virus a fait émerger de nouveaux virus très dangereux transmissibles du porc à l'homme.

6.2.2 La taille des virus

Elle varie de 20 nm (virus de la poliomyélite) à 1000 nm (virus d'Ebola).

La poliomyélite est une maladie qui touche les petits enfants et qui entraîne une paralysie. Le virus Ebola est d'actualité (2014-2015, épidémie en Afrique). Il provoque une fièvre hémorragique, mortelle. Comme comparaison *E.coli* fait 2000 sur 1000 nm. L'épaisseur d'une membrane plasmique d'un globule rouge est de 10 nm.



Comparaison des tailles de différent organismes et de virus « Diapositive de Mme Aliouche Amel »

Leur petite taille et leur **caractère parasite intracellulaire obligatoire**, nous fait rappeler les rickettsies et les chlamidies. Mais ces deux dernières s'en distinguent par les caractères résumés dans le tableau suivant :

Comparaison entre les virus et les bactéries			
	Bactéries		Virus
	Bactérie typique (<i>E. coli</i>)	Rickettsies /Chlamidies	
Parasite intracellulaire	Non	Oui	Oui
Membrane plasmique	Oui	Oui	Non
Scissiparité	Oui	Oui	Non
Filtrable par un filtre bactériologique	Non	Non / Oui	Oui
Renferme à la fois de l'ADN et de l'ARN	Oui	Oui	Non
Métabolisme générant de l'ATP	Oui	Oui / Non	Non
Ribosomes	Oui	Oui	Non
Sensible aux antibiotiques	Oui	Oui	Non
Sensible à l'interféron	Non	Non	Oui

6.2.3 Structure virale

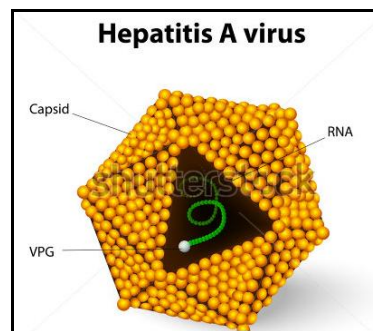
Le virion est la particule virale complète sur le plan structural. Elle possède une capsid qui entoure un matériel génétique. Parfois cette capsid est elle-même entourée d'une enveloppe. Le virion infecte une cellule et induit la synthèse de plusieurs particules virales identiques à la particule initiale.

Il existe une classification basée sur la structure virale. Elle est basée sur **la capsid** qui entoure le matériel génétique. L'ensemble capsid plus acide nucléique forme **la nucléocapside**.

La capsid est composée de sous unités protéiques appelées **capsomères**. C'est la plus petite unité structurale observable au microscope électronique. Selon l'assemblage des capsomères on définit les différentes formes de capsides, caractéristiques du type de virus.

Les virus polyédriques

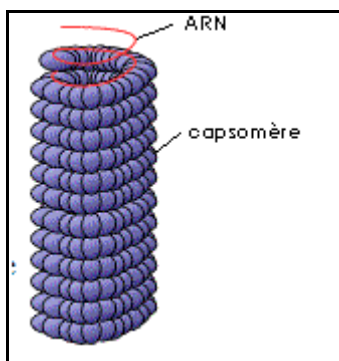
La capsid se présente sous la forme **d'un icosaèdre**, composé de 20 faces triangulaires et 12 sommets. Les capsomères forment un triangle équilatéral. Cette structure est observée chez la majorité des virus animaux, végétaux et bactériophages.



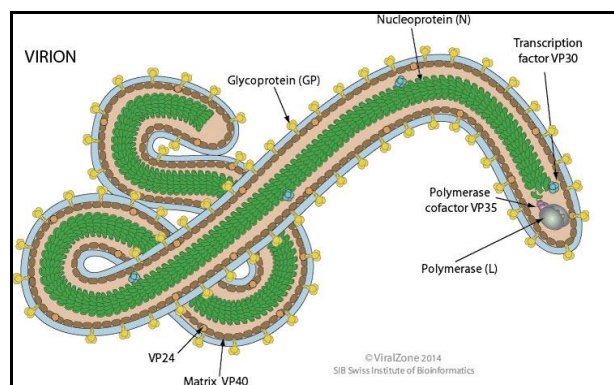
Virus polyédrique à ARN, de l'hépatite A

Les virus hélicoïdaux

Se sont des virus sous la forme d'un filament creux ou d'un cylindre. Les capsomères s'enroulent en spirale autour de l'acide nucléique. **Le virus de la mosaïque du tabac (VMT), de la rage et Ebola** ont ce type de symétrie.



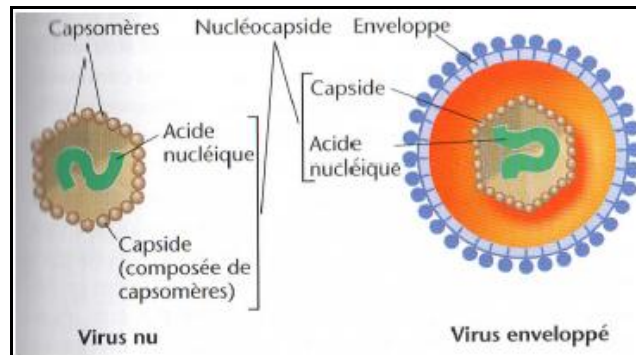
Virion VMT



Virion Ebola

Les virus enveloppés

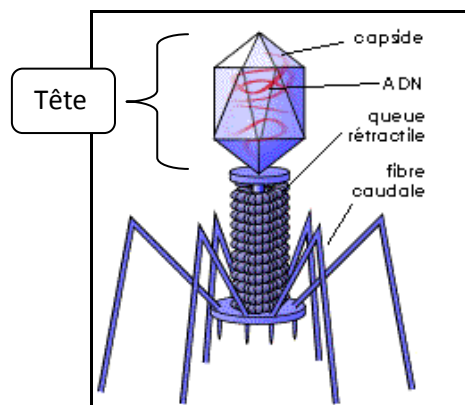
Parfois la capside est entourée d'une enveloppe. Chez les virus des animaux, cette enveloppe provient d'une portion de la membrane plasmique de la cellule hôte. Le virus y rajoute des glycoprotéines et des récepteurs viraux. Lorsque le virus possède une enveloppe, **il est dit enveloppé**, s'il n'en a pas, **il est dit nu**. Un exemple de virus enveloppé, le virus de la grippe.



Comparaison d'un virus nu et d'un virus enveloppé

Les virus complexes

Retrouvé chez certains **bactériophages comme le T4 d'E.coli**. Il possède **une tête à symétrie icosaédrique** renfermant l'acide nucléique et **une queue à symétrie hélicoïdale**.



Bactériophage à symétrie complexe

6.2.4 Différents types de virus

Les bactériophages et les virus animaux sont classés selon système de la classification de Baltimore qui se base sur le type de génome et le mode de reproduction. On distingue 07 classes de virus (classe I, II, III ...à VII).

Classe I : Génome à ADN double brin. (Bactériophages Lambda et T4 ; virus de l'herpès, poxivirus).

Une enzyme **cellulaire** transcrit l'ADN viral dans le noyau en ARNm (+) positif.

Une enzyme **virale** transcrit l'ADN viral dans le cytoplasme pour donner des virus.

Classe II : Génome à ADN simple brin. (Bactériophage ϕ 174 et virus de l'anémie du poulet, *Parvoviridae*).

Une enzyme **cellulaire** transcrit l'ADN viral dans le noyau en ARNm (+) positif.

Classe VII : Génome à ADN double brin possédant une reverse transcriptase, se répliquant avec un intermédiaire à ARN. (*Hepadnavirus*, l'agent de l'hépatite B).

Une enzyme **cellulaire** transcrit l'ADN viral dans le noyau en ARNm (+) positif.. Une transcriptase inverse fabrique de l'ADN viral à partir de l'ARNm.

Classe III : Génome à ARN double brin. (Bactériophage ϕ 6, *Reoviridae*, comme le rotavirus qui provoque des diarrhées chez les enfants).

L'enzyme virale copie dans le cytoplasme le brin négatif de l'ARN viral double brin, pour fabriquer ARNm (+) positif.

Classe IV : Génome à ARN simple brin à polarité positive. (Bactériophage MS2, entérovirus, poliovirus).

Le **brin positif** sert de matrice pour la synthèse de **l'enzyme ARN polymérase ARN dépendante(ARN replicase)**. Cette enzyme va servir à fabriquer des ARN négatifs complémentaire de l'ARN positif, pour ensuite les utiliser pour synthétiser de nombreux ARN positifs qui seront incorporés dans les capsides.

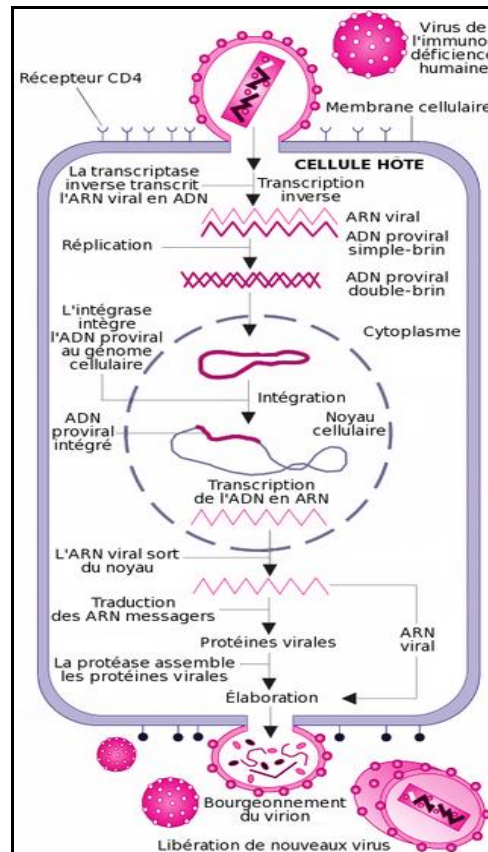
Classe V : Génome à ARN simple brin à polarité négative. (virus de la grippe, virus de la rage.

L'ARN viral (-) ne peut pas servir de messenger. L'ARNm doit être fabriqué en premier. Les cellules de l'hôte n'ont pas cette enzyme. Donc cette enzyme doit être apportée par le virion. Elle va faire de l'ARNm qui servira pour la synthèse des protéines virales et servira également comme matrice pour la transcription des ARN à polarité négative, qui seront incorporés dans les capsides.

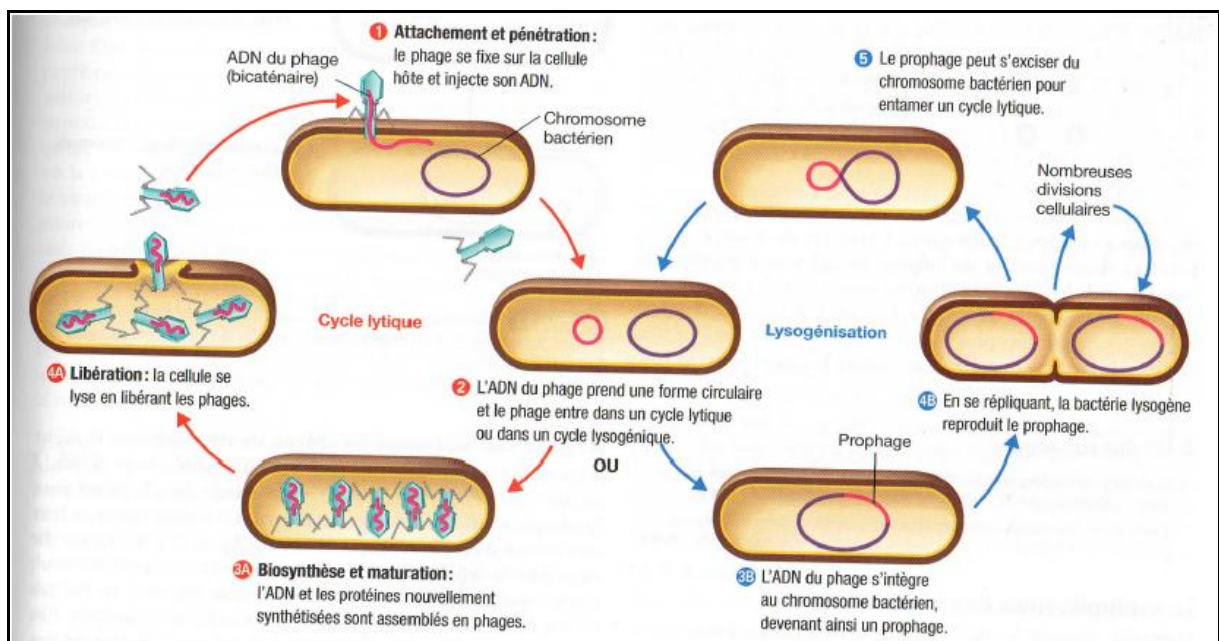
Classe VI : Génome à ARN simple brin se répliquant par un intermédiaire à ADN. (Rétrovirus, HIV agent du SIDA, Le Virus du Sarcome de Rous une forme de cancer).

L'ARN (+) de ce type de virus ne peut être utilisé comme ARNm. L'enzyme clé **est la transcriptase inverse** qui permet de synthétiser de l'ADN simple brin à partir de l'ARN positif du rétrovirus. Cet ADN simple brin va servir de matrice pour synthétiser un double brin qui sera intégré dans le génome de la cellule hôte. L'ADN double permettra la transcription d'ARNm viral qui servira pour la traduction des protéines virales et l'assemblage de nouveaux virions.

6.2.5 Deux exemples de cycles de réplication {un virus humain (HIV) et d'un bactériophage (lambda)}



Réplication du rétrovirus VIH



Cycle lytique et lysogénique du bactériophage lambda dans *Escherichia coli*

6.3 Les prions

6.4 Viroïdes

Chapitre 7 : Rôles des micro-organismes

7.1 Micro-organismes et environnement

Les micro-organismes constituent un élément très important de la biosphère. Leurs activités ont des répercussions sur le milieu environnant que nous allons parcourir brièvement.

7.1.1 Relations entre micro-organismes

Communautés microbiennes : Dans les écosystèmes de la biosphère, les micro-organismes interagissent les uns avec les autres. Les bactéries font partie de communautés comprenant des algues, des protozoaires et des champignons. Ces communautés sont retrouvées dans tous les habitats, l'eau, le sol, les plantes, les corps humains et d'animaux. Chaque habitat est caractérisé par **sa microflore**. On peut imaginer différentes situations d'interactions :

La compétition pour les nutriments, l'oxygène et l'espace. Les micro-organismes les moins résistants disparaissent.

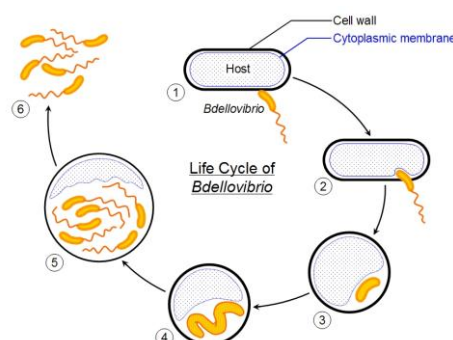
Dans les écosystèmes les moins riches en matières nutritives, il peut y avoir **antagonisme**. Un micro-organisme peut produire un antibiotique pour en éliminer d'autres. Parfois un micro-organisme peut faire baisser le pH **pour favoriser** la croissance d'un micro-organisme acidophile. Selon **Winogradsky**, les micro-organismes d'un écosystème se divisent en deux catégories : **les autochtones** et **les allochtones**. Les autochtones ne sont pas influencés par l'apport exogène de nutriments, alors que les allochtones, très minoritaires et invisibles, peuvent voir leur nombre augmenter subitement suite à cet apport.

Activité et relations alimentaires

L'ensemble des micro-organismes d'un écosystème (la biocénose) joue deux rôles très importants dans le cycle de la vie. **La biosynthèse et la décomposition** (la minéralisation de matière organique, par le biais de cycles biogéochimiques). Les Photoautotrophes sont des producteurs primaires et constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire.

Les organismes qui se nourrissent de matières organiques en décomposition sont **des saprophytes**. Il y a souvent une collaboration entre différents saprophytes pour dégrader l'ensemble des macromolécules présentes dans un biotope. On a également **des prédateurs**. Des micro-organismes qui se nourrissent d'autres micro-organismes. Les protozoaires et certains champignons fongiques sont voraces de bactéries.

Ces mêmes bactéries peuvent être **parasitées** par des virus (bactériophages). On a également un exemple d'une petite bactérie appelée *Bdellovibrio*, capable de parasiter *E. coli* ou *Pseudomonas* en milieu aquatique. Elle traverse la paroi et se loge entre celle-ci et la membrane plasmique. Elle finira par faire éclater la bactérie hôte après une multiplication intense.



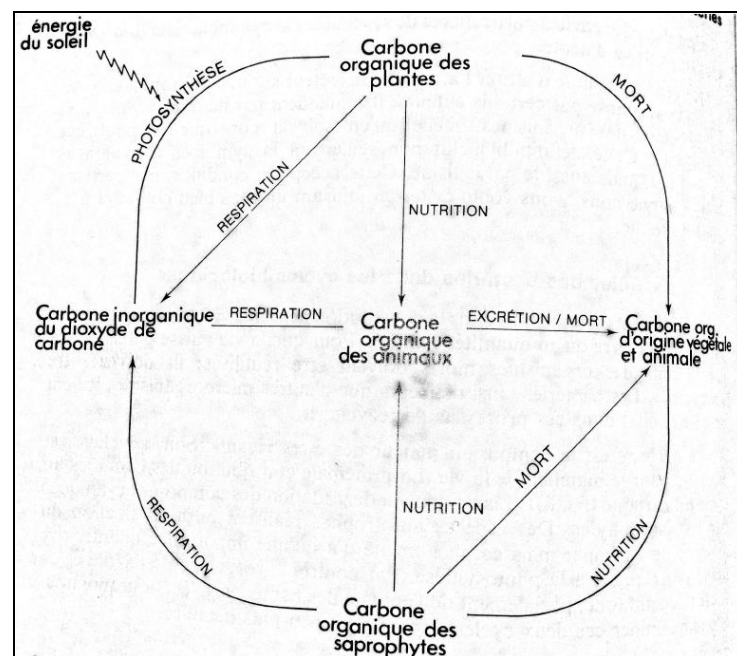
Quand une relation est bénéfique à deux organismes, **on parle de symbiose**. Cette symbiose existe entre micro-organisme et animaux végétariens. Elle lieu dans le rumen pour la dégradation de la cellulose. **Le monde végétal** a également des exemples de symbioses. Le plus connu est celui observé chez **les légumineuses avec les bactéries du genre *Rhizobium***. Ces bactéries sont fixatrices d'azote moléculaire dans des structures racinaires qu'on nomme nodules. Les plantes, ainsi aidées par des bactéries peuvent se développer sur des sols pauvres en azote.

7.1.2 Rôles des bactéries dans les cycles biogéochimiques

Les éléments simples, intervenant dans la constitution de tous les êtres vivants n'existent à la surface de la terre qu'en quantité limitées. Les constituants des organismes morts doivent être recyclés. Les micro-organismes jouent un rôle vital dans ce processus de recyclage.

Le cycle du carbone

C'est le composé majeur des êtres vivants. Les micro-organismes saprophytes dégradent la matière organique provenant de plantes et d'animaux morts. Les micro-organismes autotrophes fixent le CO_2 . Mais ce phénomène est dérisoire par rapport à l'activité photosynthétique (sur un plan quantitative).



Cycle simplifié du carbone

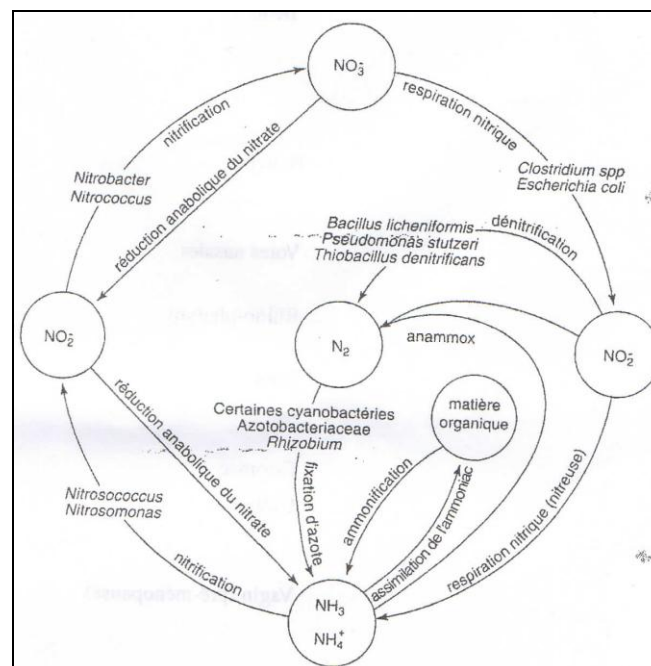
Le cycle de l'azote

Il dépend spécialement de l'activité des bactéries. Il est nécessaire à la synthèse des acides aminés, des acides nucléiques et des sucres aminés. Notre atmosphère est constituée de 78% d'azote, mais il ne peut être utilisé tel quel. Par contre sous forme d'ammoniac, il est assimilable par de nombreux organismes, incorporé sous

forme de groupement aminé. D'autres bactéries utilisent les nitrates comme source d'azote. Dans ce cas les nitrates sont d'abords réduits sous forme d'ammoniac, sans production d'énergie à l'opposé de la respiration nitrique.

Donc la décomposition de la matière organique par les saprophytes libère l'ammoniac (désamination des acides aminés). Une partie de l'ammoniac est utilisée directement comme source d'azote. Une autre est oxydée en nitrite NO_2^- puis en nitrate NO_3^- par des bactéries chimiotrophes lors de la nitrification. D'autres bactéries peuvent réaliser la **respiration nitrique** et produire de l'ATP en absence d'oxygène. Le nitrate est réduit en nitrite. Certaines bactéries peuvent franchir une étape supplémentaire en réduisant les nitrites en en azote, c'est la dénitrification, qui constitue une perte d'azote assimilable.

Cette perte est compensée par les bactéries fixatrices d'azote. Grace à une enzyme (la nitrogénase). On peut citer *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Nostoc*, *Anabaena*, les cyanobactéries. Une autre forme de conversion a été récemment identifiée chez des bactéries marines dites planctomycètes, c'est la réaction **anammox**. Elle consiste dans l'oxydation de l'ammonium NH_4^+ en absence d'oxygène. Le nitrite est accepteur d'électron et il est réduit en N_2 gazeux.

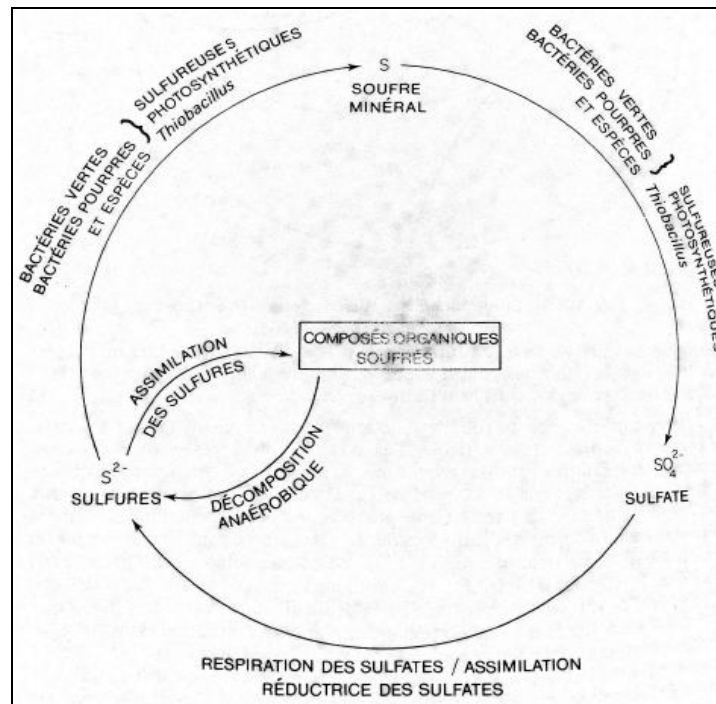


Cycle simplifié de l'azote

Le cycle du soufre

Il intervient dans la composition de deux acides aminés la cystéine et la méthionine, dans celle du CoA. Les plantes vertes et certaines bactéries peuvent assimiler le soufre sous forme de sulfate. Mais pour être incorporé, le sulfate doit être réduit. En sulfure par un processus qu'on appelle la réduction assimilatrice des sulfates. Dans la nature, il existe des micro-organismes qui assimilent directement les sulfures produits en grandes quantités dans des milieux aquatiques anaérobies par la respiration des sulfates. Ces sulfures sont à

leur tour oxydés par des chimolithotrophes comme *Thiobacillus* et par des bactéries photosynthétiques vertes et sulfureuses pourpres.



Cycle simplifié du soufre

Le cycle du phosphore

Le phosphore est important pour la synthèse des acides nucléiques, des phospholipides...Il n'est pas disponible dans la nature. Donc, c'est souvent l'élément le plus limitant pour la croissance des organismes. Le phosphore ne peut être tiré que de la désagrégation de la roche qui contient du phosphate. Dans le sol, on trouve du phosphore organique et inorganique. L'organique est recyclé par les micro-organismes.

Le cycle du fer

Il consiste dans l'oxydation du fer ferreux en fer ferriques (Fe^{2+} en Fe^{3+}), dans des conditions aérobies et à pH neutre (*Thiobacillus ferrooxidans*). En anaérobiose, l'ion ferreux s'accumule dans un processus de respiration du fer, qui utilise l'ion ferrique comme accepteur d'électrons (*Geobacter*). Enfin, d'autres bactéries transforment le fer en magnétite (Fe_3O_4) qui s'accumule dans le cytoplasme. Cette magnétite est sensible aux champs magnétiques et peut servir à des bactéries pour migrer dans les plans d'eau et marécages vers des régions plus riches en oxygène.

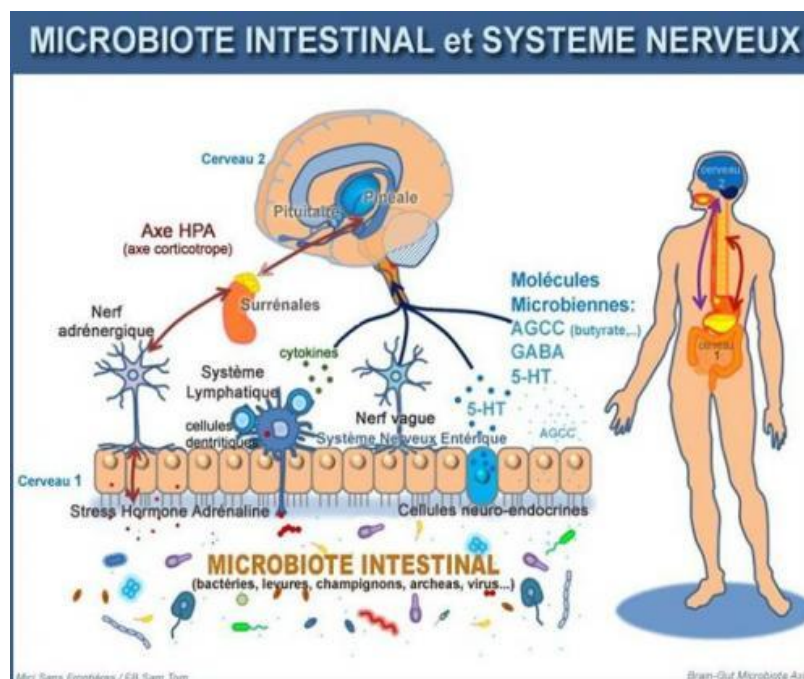
7.2 Micro-organismes et santé

7.2.1 Les microbiomes humains et les probiotiques :

Comme exemple de microbiome, on peut citer les micro-organismes du tractus intestinal ou **de la flore intestinale**, qui, à l'opposé des agents bactériens pathogènes, **sont très bénéfiques pour la santé humaine.**

Un nouveau domaine de recherche de la microbiologie s'est développé pour caractériser les différents types de flore à travers les populations humaines. En tenant compte **du régime alimentaire, de la prise d'antibiotiques sur le cours de la vie d'un individu, de l'ethnie, de la voie de naissance (par voie naturelle ou par césarienne).**

Il a été démontré clairement que les enfants nés par voie normale, développent moins d'asthme et d'allergies que les enfants nés par césarienne. Car lors de leur naissance, ils ont acquis la flore vaginale de leur mère. La destruction de la flore par les antibiotiques et par certains régimes alimentaires, induisent la disparition d'espèces bactériennes bénéfiques au profit d'autres espèces qui favoriseraient **le diabète, l'obésité. Même chose pour la dépression, l'anorexie et la boulimie (affection neuropsychiatriques).** Une corrélation entre **l'autisme** et certaines espèces bactérienne est entrain d'être établie. **Le système immunitaire** est stimulé, voir éduqué par la flore intestinale. Dans les prochaines années, il faudrait s'attendre à voir sur le marché des médicaments dits « **probiotiques** ». Ils seront constitués d'un mélange de bactéries choisies sur la base des symptômes à traiter ou le confort à atteindre.



<http://jalimentemasante.com/microbiote-intestinal-et-syst%C3%A8mes-nerveux.html>

L'humain est l'hôte de centaines de milliers de milliards de créatures

La colonisation débute par transmission microbienne maternelle au fœtus.
Le mode de vie et la façon dont la mère se nourrit avant et pendant sa grossesse est primordiale.

De nouvelles colonisations se produisent lors de la naissance. Les espèces diffèrent selon le mode d'accouchement; par voie vaginale (préférable) ou par césarienne.

Le lait maternel nourrit le bébé en lui apportant d'autres espèces essentielles à sa santé présente et future.
Le lait maternel contient plus de 700 espèces microbiennes différentes.

PEAU
(toute la surface de la peau)

CELLULES HUMAINES VS CELLULES MICROBIENNES

le corps humain est constitué de plus de plus de 10'000 milliards de cellules
MAIS
seulement 10% sont réellement "nous"

La partie noire représente le nombre de cellules humaines (y compris les cellules cardiaques, les cellules osseuses, etc)

Toute la partie grise représente le nombre de cellules de nos microbes.
(plus de cent mille milliards de bactéries, virus, champignons, archées protozoaires,...)

CHEVEUX

SPHERE ORL (bouche, nez, gorge, oreilles,...)

OESOPHAGE

POUMONS

ESTOMAC

INTESTINS

VOIES ET ORGANES SEXUELS
(hommes et femmes)

Nos gènes microbiens sont 360 fois plus nombreux que nos gènes humains
parmi nos gènes microbiens, plus de 8% sont nos virus sans virus pas de formation embryonnaire, pas de vie.

GENES HUMAINS VS GENES MICROBIENS

Dans le corps humain, les gènes humains sont considérablement moins nombreux que les gènes microbiens

18'000 à 23'000 gènes humains → **plus de 8 millions** de gènes microbiens → ...

la totalité des gènes relatifs à 10'000 espèces microbiennes recensées sur une population en bonne santé est estimée à plus de 8 millions de gènes microbiens

source NIH
Human Microbiome Project
2013)

PIEDS ET ONGLES

fb sam tom / Team MICI infos / MICI Sans Frontières/Crohniglobin

<http://crohn.superforum.fr/t2431-4-candidose-changez-de-regard-mici-sci-etc>

7.2.2 Les maladies infectieuses

Une maladie infectieuse est une altération de l'état normal d'un individu ou de l'un de ses organes suite à un contact avec un agent infectieux. Dans le cas des micro-organismes, cet agent peut être, un virus, un champignon, une bactérie ou un protozoaire.

Ces maladies infectieuses peuvent être **contagieuses ou non**. Certaines maladies sont bénignes et d'autres plus graves, pouvant entraîner la mort.

En épidémiologie, on étudie **le cycle de la maladie infectieuse**, qui, pour une maladie donnée, doit répondre à cinq questions majeures.

1-Par quel agent la maladie est causée ?

La cause directe de la maladie doit être identifiée en appliquant le postulat de Koch. Le laboratoire de diagnostic doit l'isoler et tester différents agents de contrôle de micro-organisme, afin de proposer éventuellement une thérapie.

2-Quel est le foyer et le réservoir de l'agent infectieux ?

Si on identifie l'origine d'une maladie, on peut contrôler le cycle infectieux. Sa transmission sera stoppée. Le foyer est le lieu à partir duquel l'agent est transmis directement à l'hôte. Cela peut être une source d'eau, un aliment, un animal. Cela peut être aussi un être humain qui revient d'un voyage durant lequel il a contracté un agent infectieux qui n'existe pas dans son pays d'origine, il est appelé **porteur**. Il y a différents **types de porteur** :

Actif : il présente les symptômes de la maladie.

Sain : Il porte en lui les germes pathogènes mais il n'est pas malade et ne sera jamais malade.

En voie de guérison : Il n'est plus malade, mais porte en lui encore l'agent pathogène.

En incubation : Il porte l'agent pathogène depuis peu, mais il n'a pas encore de symptômes cliniques

Le réservoir est le lieu naturel dans lequel l'agent infectieux est retrouvé naturellement. Beaucoup de maladies infectieuses sont transmises par des animaux, se sont **des zoonoses**. Les animaux peuvent être domestiques ou sauvages.

3-Quel est le mode de transmission ?

Pour se maintenir dans une population, un agent infectieux doit se transmettre d'un hôte à l'autre. On distingue quatre modes de transmission.

La transmission **par un aéroportée**

La transmission **par contact**

La transmission **par un vecteur inanimé ou passif**

La transmission **par un vecteur animal**

Dans la **transmission aérienne**, l'agent est transporté par des microgouttelettes d'eau ou une poussière en suspension. Si les hommes sont à l'origine de la maladie, cette transmission **se fait par la toux et les éternuements**.

La **transmission par contact** se fait par attouchement entre la source et l'hôte. Elle peut être directe ou indirecte.

La **transmission par un vecteur inanimé** se fait par des objets, instruments chirurgicaux, l'eau les aliments.

La **transmission par un vecteur animal** se fait par des arthropodes et par des vertébrés (chiens, chat et autres animaux sauvages).

4-Pourquoi l'hôte est-il sensible à l'agent infectieux ?

Cela dépend de la virulence de l'agent et des défenses immunitaires de l'hôte. Le facteur génétique et l'alimentation sont également pris en compte.

5-Comment l'agent infectieux est sorti de l'hôte ?

La sortie est aussi importante que l'entrée dans la compréhension et la lutte contre la maladie infectieuse. Les voies de sorties sont souvent passives (sécrétion, urine, selles, salive).

7.2.3 Exemples de maladies virales, bactériennes, parasitaires, fongiques et leurs modes de transmission.

Maladie virales transmises par l'air : la varicelle, la grippe, la rougeole, le SRAS (syndrome respiratoire aigu sévère), la rubéole.

Maladies virale transmises par un contact : Le SIDA, l'herpès labiale et génital, le rhume par contact des mains, les hépatites virales.

Maladies virales transmissible par un vecteur passif (eau, aliment) : Les gastroentérites virales, l'hépatite A et E, la poliomyélite.

Maladies virales transmises par un vecteur animal : la rage par la morsure d'animaux enragés, les fièvres hémorragiques (Ebola, Marburg). Les virus sont portés par des primates et des chauves-souris.

Maladies bactériennes transmises par l'air : La pneumonie, la diphtérie, la légionellose, les méningites, la tuberculose...

Maladies bactériennes transmises par des arthropodes : Les tiques, les poux, les puces peuvent transmettre des maladies très graves, comme la peste (*Yersinia pestis*) , le typhus (*Rickettsia typhi*), la maladie de Lyme (*Borrelia sp*).

Maladie bactérienne transmises par contact : La gangrène gazeuse à clostridies, la conjonctivite à chlamydias, la lèpre par *Mycobacterium leprae*, l'ulcère gastrique par *Helicobacter pylori* et les maladies staphylococciques à manifestation dermatologique comme l'impétigo, les furoncles, le syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée, qui par une toxine codée par un gène plasmidique, décolle l'épiderme et met la peau à nu. Le tétanos qui forme des endospores, le trachome. Dans ce groupe, On peut rajouter à ceux-ci, **les maladies bactériennes, sexuellement transmissible** comme la syphilis, le chancre mou, la vaginite, l'urétrite, la blennorragie à gonocoque qui atteint les muqueuses génitales.

Maladies bactériennes transmises par l'eau et les aliments : On parle d'empoisonnement alimentaire. Si le micro-organisme est apporté par les aliments puis, il se développe dans le tube digestif de l'hôte avant d'envahir d'autres tissus, on parle **d'infection alimentaire**. Si le micro-organisme se développe dans l'aliment, puis sécrète une toxine qui va être ingérée, on parle **d'intoxication alimentaire**, les plus connues sont le **botulisme** (*Clostridium botulinum*) trouvé dans les conserves et l'intoxication alimentaire staphylococciques (*S. aureus*).

Parmi les **infections alimentaires** on distingue les gastro-entérites (*Campylobacter*), le cholera (*Vibrio*), la listeriose (*Listeria*) transmise par le lait. Les salmonelloses (eau et nourritures contaminées par les déjections d'animaux contenant des *Salmonella*).

Une forme de dysenterie bactérienne appelée shigellose. Les shigelles sont portées uniquement par les humains. Elles sont parasites intracellulaires des cellules intestinales et provoquent des diarrhées une inflammation des tissus intestinaux.

Les ***E. coli* entéropathogènes** très fréquentes dans les diarrhées chez le nourrisson. Les ***E. coli* entérotoxiques**, responsables des diarrhées dans les pays en développement et chez le touriste de passage. Les ***E. coli* entéro-invasives**, pathogénie identique à celle de *Shigella*. Le pouvoir pathogène dans les 3 cas est contrôlé par une information génétique portée par un plasmide, codant pour des entérotoxines et des facteurs de colonisation permettant l'attachement des bactéries à la surface de l'intestin (épithélium intestinal).

Les protozoaires sont impliqués dans des maladies parasitaires très graves. On peut citer **l'amibiase** (amibes), le **paludisme**, la **toxoplasmose** (*apicomplexa*), la **leishmaniose**, la **maladie du sommeil**, la **maladie de Chagas** (flagellés sanguins et tissulaires) et la **trichomonase** (flagellés des organes génitaux). Ces trois groupes de maladies sont transmis respectivement par l'eau, par des piqûres d'insectes vecteurs, par relation sexuelle.

Les champignons microscopiques causent également certaines maladies qu'on regroupe sous le nom de **mycoses**.

Ces mycoses peuvent être **cutanées et sous-cutanées, systémiques (phagocytes, poumon, peau, os, cerveau, viscères) et opportunistes** (chez les patients immunodéprimés).

7.3 Micro-organismes et industrie

7.3.1 Les aliments et leur détérioration

Les aliments sont riches en substances nutritives. Lorsqu'ils ne sont pas conservés correctement, ils sont détériorés par la croissance des micro-organismes. La couleur, le goût, la valeur nutritive sont modifiés. Leur consommation peut également entraîner une infection et/ou une intoxication alimentaire et parfois la mort. Pour éviter ce type de problème, il faut respecter les règles de conservation selon le type d'aliment. Pour contrôler la détérioration des aliments il faut utiliser les méthodes physiques et chimiques qui contrôlent la croissance microbienne.

La sécurité alimentaire implique la détection rapide des micro-organismes avant (contrôle des matières premières), durant et après la fabrication des aliments.

7.3.2 Les aliments fermentés

La fermentation à son origine, servait pour conserver les aliments en favorisant la croissance d'une flore microbienne naturelle ou rajoutée. Depuis, les produits fermentés ont montré des qualités et des avantages

confirmés pour la santé (probiotiques). On distingue la fermentation des produits laitiers, la production du fromage, la viande et le poisson, le pain, les légumes fermentés et la production de boissons alcoolisées.

7.3.3 Le traitement des eaux usées

Comme pour les aliments, il est impératif d'analyser l'eau de consommation ou de récréation. Nous avons vu que de nombreuses maladies virales, bactériennes et autres sont transmissibles par cet élément vital qu'est l'eau. L'un des problèmes majeur pour la qualité de l'eau est la contamination fécale. Le laboratoire de contrôle de qualité recherchera des organismes indicateurs comme indices de contamination. Les plus recherchés sont les coliformes.

L'activité humaine domestique ou industrielle génère des quantités phénoménales **d'eaux usées**. L'eau potable est une denrée rare dans certaines régions du globe. On doit impérativement récupérer et traiter celles qu'on a utilisées. Les ingénieurs et les biologistes ont développé **des stations d'épuration** qui reproduisent ce qui se passe dans la nature au niveau des lacs et des rivières. Les micro-organismes jouent un grand rôle dans ce traitement. Ils vont au fur et à mesure, en complément d'étapes physico-chimiques, débarrasser l'eau de la matière organique et des polluants. Les micro-organismes sont utilisés en tant que **biomasse dans les boues activées** ou comme **lits bactériens sur des pierres** avec formation **de biofilms**. Dans les deux cas l'aérobiose est recommandée, celle-ci est garantie par des mélangeurs.

7.3.4 La microbiologie industrielle

La microbiologie industrielle est une facette des biotechnologies. Elle utilise les micro-organismes et leur biodiversité pour produire ou modifier des substances d'intérêt médical, alimentaire, énergétique, agronomique ou environnemental. Les microbiologistes doivent passer par plusieurs étapes avant de mettre au point un procédé efficace.

Isolement des souches

Les microbiologistes doivent faire des **bioprospections** dans différents biotopes afin d'isoler de la nature des souches capables de faire le produit ou la transformation recherchée. **Les écosystèmes extrêmes** en termes de température, de pH, de salinité fournissent des souches avec **un équipement enzymatique qui sort souvent de l'ordinaire**. L'écologie microbienne est la spécialité qui permet de faire ce travail. La première difficulté est de trouver le bon milieu de culture, qui donnera un bon rendement de croissance, sans que celui-ci puisse coûter très cher. Si la culture est impossible, ou difficile, on peut procéder **par génie génétique et biologie combinatoire** pour exprimer un gène d'un organisme X dans un micro-organisme Y facile à cultiver.

La culture industrielle

Dans un environnement contrôlé, comme une installation industrielle, la croissance microbienne se fait dans **des fermenteurs** ou bioréacteurs. Tous les paramètres de la croissance sont contrôlés, le pH, l'oxygénation, la température, la production des métabolites. Le volume des fermenteurs varie de 0.5 litre à 100.000 litres. Le produit fabriqué par le micro-organisme durant la croissance est **dit métabolite primaire**. S'il est fabriqué après la croissance il est dit **métabolite secondaire**.



Bioréacteur de paillasse



Bioréacteur industriel

Les produits de la microbiologie industrielle. Le tableau suivant cite quelques exemples de produits microbiens produits industriellement

<i>Substances</i>	<i>Micro-organismes</i>
<i>Produits médicaux</i>	
Antibiotiques	<i>Penicillium, Strptomycetes, Bacillus</i>
Insuline, hormone de croissance Interféron	<i>E. coli, Saccharomyces cerevisiae et autres</i>
Transformation des stéroïdes	<i>Rhizopus et Arthrobacter</i>
<i>Additifs alimentaires</i>	
Acide aminé	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Vitamines	<i>Blakeslea, Asbya, Eromothecium</i>
Acide citrique	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Biocarburants</i>	
Hydrogène	<i>Photosynthétiques</i>
Méthane	<i>Methanobacterium</i>
Ethanol	<i>Zymomonas, Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
<i>Produits industriels</i>	
Ethanol à partir de glucose	<i>Saccharomyces cerevisiae,</i>
Ethanol à partir de lactose	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Enzymes	<i>Aspergillus, Bacillus, Mucor</i>
Acétone et butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>Produits agricoles</i>	
Phytohormone	<i>Gibberella fujikuroi</i>

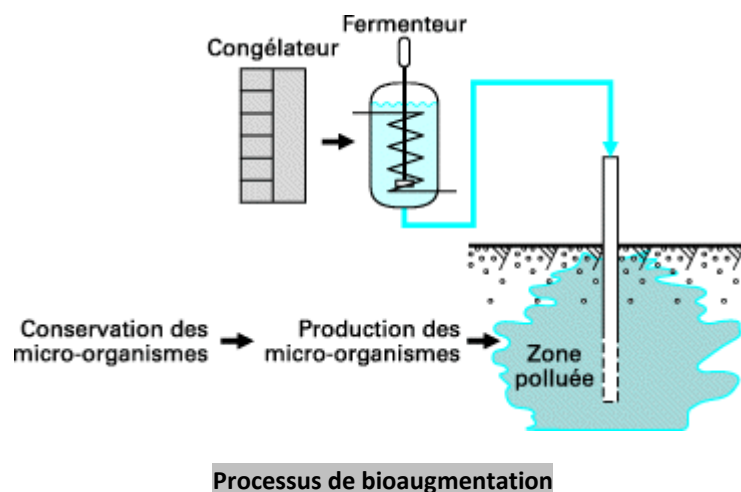
7.3.5 Utilisation des micro-organismes dans des milieux naturels

Les eaux, les sédiments et les sols pollués par des hydrocarbures, du PCB (Polychlorobiphényle), le trichloréthylène (solvant dégraissant et antitaches domestique), des pesticides ou des métaux lourds, peuvent être nettoyés (dépollués) par des micro-organismes. Les techniques utilisées sont **la bioremédiation, la biostimulation et la bioaugmentation**. Ces traitements peuvent être effectués **sur site**, ou **hors site**. Selon la nature du polluant, **le traitement peut être aérobie** (pour les hydrocarbures) ou **anaérobie** (pour le PCB). Il faudrait donc stimuler les micro-organismes ayant le bon type respiratoire.

La bioremédiation est une biodégradation de polluants par un ensemble de micro-organismes inconnus, présents sur le site pollué. La biodégradation peut induire un changement mineur dans la structure du polluant, elle peut le fragmenter ou le minéraliser complètement.

La biostimulation consiste à stimuler au moyen d'adjuvants chimiques ou biochimiques la dégradation des polluants par les micro-organismes autochtones. C'est l'une des techniques de bioremédiation la plus utilisée du fait de son faible coût et de sa facilité à mettre en œuvre.

La bioaugmentation est l'apport de micro-organismes à un site pollué, pour rendre possible ou améliorer la biodégradation d'un polluant dans le sol ou dans la nappe phréatique. La bioaugmentation est indispensable lorsque le milieu pollué ne contient pas les micro-organismes capables d'effectuer la biodégradation.



7.4. Micro-organismes et agriculture

7.4.1 La rhizosphère, les rhizobactéries et « PGPR »

La rhizosphère est le volume de sol influencé par les racines. On distingue en général le rhizoplan qui est l'interface racine/sol et le sol rhizosphérique situé au voisinage immédiat de la racine et soumis à son influence. Elle est le lieu des échanges entre sol, racines, micro-organismes et faune associés. Ces échanges, intenses, se traduisent par des flux dans les deux sens, d'eau et de nutriments.

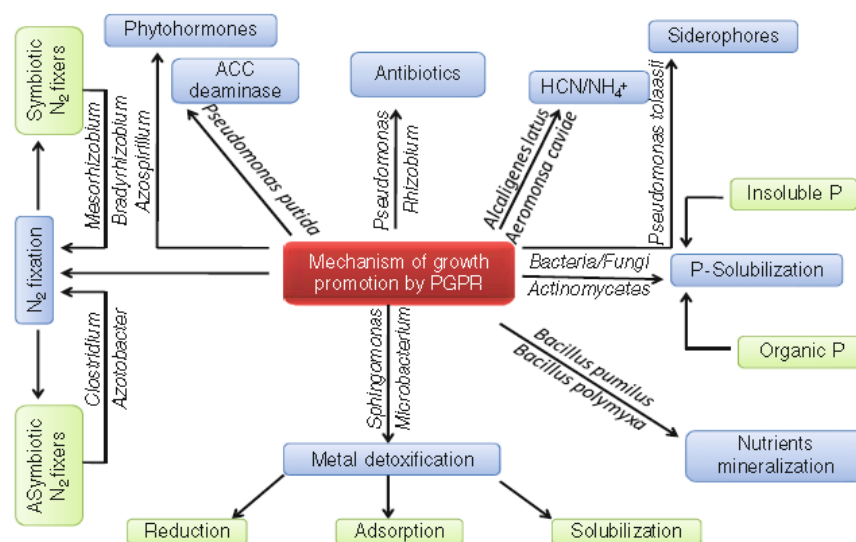
La communauté microbienne joue un rôle notable dans l'amélioration et la stabilisation de la structure du sol. Plusieurs études ont montré que l'agrégation et la stabilité d'un sol dépend de sa nature et de sa teneur en matière organique. Ils jouent aussi un rôle significatif dans l'état de santé des plantes, certaines sont

nuisibles, d'autres sont bénéfiques et certaines ne semblent avoir aucun effet. On définit les bactéries associées aux racines des plantes comme des **rhizobactéries**.

Les bactéries qui stimulent la croissance des plantes sont appelées « **PGPR** » (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

De nombreuses bactéries appartenant à différents genres composent les PGPR. On peut citer, par exemple, des souches de *Pseudomonas*, d'*Arthrobacter*, d'*Azospirillum*, d'*Azotobacter*, de *Rhizobium*, d'*Enterobacter*, de *Serratia*, de *Klebsiella*, et de *Clostridium*. Les espèces de *Bacillus* sont les types les plus communs et les plus prédominants isolés à partir de sol. Les effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale couvrent deux aspects qui se traduisent soit par l'accroissement de la masse aérienne et racinaire, l'élongation racinaire et la levée accélérée des plantules, ou par la protection des plantes contre les agressions par les organismes phytopathogènes. Les mécanismes bactériens peuvent avoir lieu à l'extérieur de la plante ou à l'intérieur de la plante. On peut citer :

1. La solubilisation des phosphates, la fixation de l'azote et les minéraux nutritifs, rendant ces aliments disponibles pour la plante.
2. La production de phytohormones telles que l'acide d'indole-3-acétique (IAA).
3. La répression des micro-organismes pathogènes du sol (par la production du cyanure d'hydrogène, de sidérophores, d'antibiotiques. De plus, les PGPR peuvent contribuer dans l'amélioration de la résistance de la plante au stress biotique et abiotique (la salinité, la sécheresse et à la toxicité des métaux lourds).



Les mécanismes de stimulation de la croissance des plantes par les PGPR

7.4.2 Les bioinsecticides ou biopesticides

On peut utiliser des micro-organismes comme agent de lutte contre les insectes ravageurs, nuisibles aux plantes. Ces micro-organismes ne présentent aucun danger pour l'homme, les animaux et les plantes.

Les meilleurs du point de vue pratique, sont les bactéries, car on peut les produire en grande culture (fermenteur). Le gène de

Quelques bactéries appartenant au genre *Bacillus* (*B. thuringiensis* et *B. popilliae*). Utiliser pour protéger des cultures de légumes. (Voir fin du chapitre 2, le cristal parasporal de l'endospore de *B. thuringiensis*).

Le gène du bio-insecticide de *B. thuringiensis* a été cloné dans des plantes (Organisme génétiquement modifié, **OGM**). Dans ce cas, on a plus besoin d'utiliser des bactéries.

Quelques virus qui infectent les insectes (polyédrose nucléaire et cytoplasmique NPV et CPV ; la granulose, GV). Ils agissent sur des papillons. Le plus connu est commercialisé sous le nom **d'Elcar** pour lutter contre un ver du coton.

Les champignons microscopiques sont les plus nombreux. On en compte quelques centaines capables d'infecter les insectes. Les plus utilisés pour combattre le doryphore de la pomme de terre et le cercope de la canne à sucre, sont *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*.

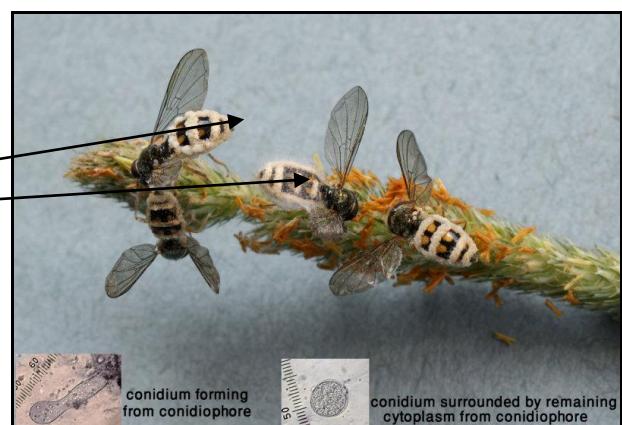
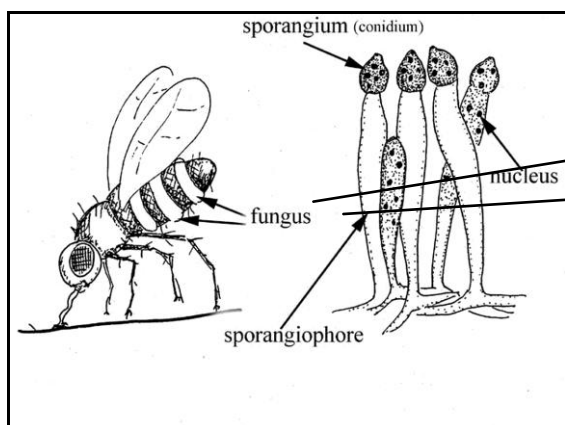


Vers gris du doryphore de la pomme de terre



Doryphore

Verticillium et *Entomophthora* pour lutter contre les pucerons.



Insectes infectés par *Entomophthora*